

**Université de Sherbrooke**

**Rôles distincts des divers BR-Smads  
dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal**

**Par  
Sébastien Marcoux  
Département d'anatomie et de biologie cellulaire**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)  
en biologie cellulaire**

**Sherbrooke, Québec, Canada  
Septembre 2011**

**Membre du jury d'évaluation  
Professeure Nathalie Perreault, programme de biologie cellulaire  
Professeur Guillaume Grenier, programme de biologie cellulaire  
Professeur Éric Rousseau, programme de physiologie**



Library and Archives  
Canada

Published Heritage  
Branch

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-93305-3*

*Our file Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-93305-3*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

Canada

## Rôles distincts des divers BR-Smads dans l'homéostasie de l'épithélium intestinal

Par

Sébastien Marcoux

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention d'un diplôme de maître ès sciences (M. Sc.) en biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les Bmps sont des morphogènes appartenant à la superfamille du Tgf- $\beta$  et sont impliqués dans plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, la différenciation et le maintien de l'homéostasie autant chez l'embryon que chez l'adulte. La liaison des Bmps aux récepteurs entraîne l'activation au niveau du cytoplasme de facteurs de transcription nommés les BR-Smads (Smad1, 5 et 8). Parmi les rôles attribués à la voie de signalisation des Bmps, très peu d'études ont démontré précisément quels BR-Smads médiaient ces rôles et fonctions. Une étude au sein de notre laboratoire avait préalablement caractérisé les rôles de la voie de signalisation des Bmps au niveau de l'épithélium intestinal suite à la délétion conditionnelle de *Bmpr1a* chez la souris. Nous avons voulu déterminer les rôles spécifiques de chaque BR-Smad au niveau de l'épithélium intestinal. Nous avons utilisé le système de délétion conditionnelle Cre/loxP afin d'effectuer la délétion individuelle de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* strictement au sein des cellules épithéliales intestinales à l'aide de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur tronqué de la *Villine*. Des analyses de prolifération et de migration par incorporation de BrdU ont permis de démontrer que Smad1 était impliqué dans le contrôle de la prolifération tandis que Smad5 était impliqué dans la migration des cellules épithéliales intestinales. Le marquage des différents types de cellules sécrétrices composant l'épithélium de l'intestin ont été effectués. Les résultats obtenus ont permis de démontrer que les rôles des Bmps dans la différenciation des cellules caliciformes seraient médiés par Smad1 et Smad5 alors que Smad1 serait le seul BR-Smad impliqué dans la différenciation des cellules de Paneth. Les défauts dans la détermination des cellules entéroendocrines observés chez les souris *Bmpr1a*<sup>ACEI</sup> n'ont pas été observés suite à la délétion individuelle de chacun des BR-Smads. Ce résultat suggère donc la présence d'une compensation entre les divers BR-Smads ou que les défauts de la détermination des cellules entéroendocrines nécessitent la perte de deux ou des trois BR-Smads en même temps. Nous avons également généré des modèles cellulaires stables exprimant diverses constructions de shARN contre chaque BR-Smad chez les cellules IEC-6. Les résultats obtenus *in vitro* confirment l'implication de Smad1 dans le contrôle de la prolifération et le rôle de Smad5 dans la migration de cellules épithéliales intestinales. De plus, ces modèles cellulaires permettront l'étude plus approfondie des mécanismes impliqués dans la prolifération et la migration suite à la délétion de Smad1 et Smad5 respectivement en plus de faciliter la combinaison de la perte de plusieurs BR-Smads en même temps.

Les résultats obtenus démontrent que les BR-Smads ont des rôles distincts au niveau de la prolifération, de la migration et de la différenciation de l'épithélium intestinal, mais suggèrent également que les BR-Smads aient des rôles combinatoires et compensatoires entre eux dans certaines fonctions cellulaires.

**Mots clés :** Bmps, BR-Smads, différenciation cellulaire, prolifération, migration, souris génétiquement modifiées, shARN

## Table des matières

<b>Liste des figures</b> .....	VII
<b>Liste des tableaux</b> .....	IX
<b>Liste des abréviations</b> .....	X
<b>I. Introduction</b> .....	1
1.1 L'intestin grêle .....	1
1.2 L'axe crypte-villosité .....	1
1.3 L'épithélium intestinal .....	2
1.3.1 Les cellules souches .....	2
1.3.2 Cellules progénitrices prolifératives .....	4
1.3.3 Cellules épithéliales différenciées .....	4
1.3.4 Rôle de barrière physique .....	5
1.4 Développement et morphogenèse de l'axe crypte-villosité chez la souris .....	5
1.5 Les Bmps.....	6
1.5.1 La voie de signalisation des Bmps .....	7
1.5.2 Les récepteurs .....	8
1.5.3 Les Smads.....	9
1.6 Les domaines des Smads.....	10
1.6.1 Le domaine MH1 et l'ADN.....	10
1.6.2 Le domaine linker et la régulation des R-Smads.....	12
1.6.3 Le domaine MH2 et les interactions protéine-protéine .....	13
1.7 Régulation de la voie des Bmps .....	13
1.7.1 Les I-Smads .....	13
1.7.2 Les Smurfs.....	14
1.7.3 Les antagonistes extracellulaires des Bmps .....	15
1.7.4 Pseudo récepteur.....	15
1.7.5 Corécepteurs .....	15
1.8 Patron d'expression des divers BR-Smads chez la souris.....	16
1.9 Rôles distinct des BR-Smads chez la souris .....	16

1.9.1 Délétion classique des BR-Smads .....	16
1.9.2 Délétion conditionnelle de <i>Smad1</i> ou de <i>Smad5</i> au sein de l'épithélium pulmonaire .....	17
1.10 Les Bmps au niveau de l'intestin .....	18
1.10.1 Surexpression de <i>Noggin</i> au niveau de l'intestin .....	18
1.10.2 Délétion conditionnelle de <i>Bmpr1a</i> au niveau intestinal.....	19
1.10.3 Délétion conditionnelle de <i>Bmpr1a</i> au niveau de l'épithélium intestinal .....	20
1.10.4 Délétion conditionnelle de <i>Smad5</i> au sein de l'épithélium intestinal.....	21
1.11 Projet de recherche, hypothèse et objectifs .....	23
<b>II. Matériels et méthodes</b> .....	25
2.1 Lignées de souris utilisées et croisement .....	25
2.2 Identification et génotypage des souris .....	27
2.3 Euthanasie des souris .....	27
2.4 Fixation des tissus et inclusion dans la paraffine .....	28
2.5 Immunofluorescence sur les coupes histologiques .....	29
2.6 Coloration à l'hématoxyline et l'éosine (H & E) .....	31
2.7 Coloration à l'alcan bleu .....	31
2.8 Dissociation et recouvrement des cellules épithéliales intestinales .....	32
2.9 Isolement de fractions enrichies en cellules épithéliales intestinales.....	33
2.10 Extraction d'ARN .....	33
2.11 DNase et RT-PCR.....	34
2.12 Analyse du niveau d'expression des ARNm .....	35
2.12.1 Analyse en PCR quantitative.....	35
2.12.2 Analyse en PCR semi-quantitative .....	36
2.13 Extraction de protéines.....	36
2.13.1 Protéines tissulaires .....	36
2.13.2 Protéines de cellules en culture .....	37
2.13.3 Extraction de protéines nucléaires de cellules épithéliales de jéjunum de souris .....	38
2.14 Immunobuvardage.....	38

2.15 Génération des séquences de shARN.....	40
2.16 Appariement des oligonucléotides et clonage dans le vecteur pLentiV6-U6 .....	44
2.17 Cultures cellulaires.....	44
2.18 Production de Lentivirus et infection des cellules IEC-6.....	45
2.19 Tests de blessure sur une monocouche de cellules .....	46
2.20 Fixation et coloration des cellules au Bleu Evans.....	47
2.21 Cinétique de multi-blessures .....	47
2.22 Courbe de prolifération cellulaire .....	47
2.23 Valeurs morphométriques .....	48
2.24. Densitométrie .....	48
2.25 Décomptes cellulaires et analyses statistiques .....	49
<b>III. Résultats .....</b>	<b>50</b>
3.1 Génération et détermination du génotype des souris .....	50
3.2 Validation de la perte des <i>Smads 1, 5</i> ou <i>8</i> au sein de l'épithélium intestinal .....	52
3.3 Impact de la délétion de chaque BR-Smad sur l'architecture de l'axe crypte-villosité .....	54
3.3.1 Longueur des compartiments de l'axe crypte-villosité .....	54
3.3.2 Nombre de cryptes par villosité.....	54
3.4 Impact de la délétion des BR-Smads sur la prolifération de l'épithélium .....	56
3.4.1 État des cellules souches chez les souris <i>Smad1</i> <sup>ΔCEI</sup> .....	56
3.4.2 Régulation du cycle cellulaire chez les souris <i>Smad1</i> <sup>ΔCEI</sup> .....	58
3.5 Impact de la délétion des BR-Smads sur la migration de l'épithélium intestinal .....	60
3.5.1 Réorganisation du cytosquelette d'actine chez les souris <i>Smad5</i> <sup>ΔCEI</sup> .....	62
3.6 Implication des BR-Smads dans la différenciation des cellules de type sécréteur de l'épithélium intestinal.....	64
3.6.1 Implication de <i>Smad1</i> et <i>Smad5</i> dans la différenciation des cellules caliciformes .....	64
3.6.2 La délétion individuelle des BR-Smads n'affecte pas la détermination des cellules entéroendocrines.....	67
3.6.3 Implication de <i>Smad1</i> dans la différenciation des cellules de Paneth .....	67

3.7 Récapitulation des phénotypes retrouvés chez les <i>Smad</i> <sup>ACEI</sup> versus ceux obtenus chez les souris <i>Bmpr1a</i> <sup>ACEI</sup> .....	70
3.8 Génération de populations stables de cellules IEC-6 possédant un shARN dirigé contre chacun des BR-Smads .....	71
3.8.1 Smad5 est impliqué dans la migration des cellules IEC-6 .....	72
3.8.2 Implication de Smad5 dans les étapes d'initiation de la migration cellulaire .....	73
3.8.3 Implication de Smad1 dans la régulation de la prolifération des cellules IEC-6 .....	73
<b>IV. Discussion</b> .....	77
4.1 Impact de la délétion individuelle des BR-Smads sur l'architecture de l'axe crypte-villosité .....	77
4.1.1 Smad1 et son rôle dans la prolifération cellulaire .....	77
4.1.2 Smad5 et son rôle dans la migration cellulaire .....	80
4.2 Implication des BR-Smads dans la différenciation et la détermination des cellules de type sécréteur .....	84
4.2.1 Smad1 et Smad5 sont impliqués dans la différenciation des cellules caliciformes .....	84
4.2.2 La détermination des cellules entéroendocrines dépend de plus d'un BR-Smad à la fois .....	85
4.2.3 Smad1 est le seul BR-Smad impliqué dans la différenciation des cellules de Paneth .....	86
4.3 Compensation et dosage entre les divers BR-Smads .....	87
4.4 Rôles de la voie non canonique des Bmps .....	88
<b>V. Conclusions et perspectives</b> .....	89
<b>VI. Remerciements</b> .....	93
<b>VII. Bibliographie</b> .....	94

## Liste des figures

Figure 1. Architecture de l'axe crypte-villosité et principaux types cellulaires composant son épithélium.....	2
Figure 2. Localisation des cellules souches épithéliales intestinales.....	3
Figure 3. Morphogenèse de l'axe crypte-villosité .....	6
Figure 4. Impact de différentes concentrations d'un morphogène sur des cellules de même type.....	7
Figure 5. Voie de signalisation des Bmps.....	8
Figure 6. Domaine des divers Smads.....	10
Figure 7. Le domaine MH2 est responsable de la spécificité des gènes cibles induits par les Smads.....	14
Figure 8. Gradient des Bmps le long de l'axe crypte-villosité .....	19
Figure 9. Impact de la délétion de <i>Bmpr1a</i> sur les cellules de type sécréteur de l'épithélium intestinal.....	22
Figure 10. Multi-blessures en forme de quadrillé sur une monocouche de cellules.....	48
Figure 11. Détermination du génotype des lignées de souris utilisées .....	51
Figure 12. Validation de la perte de <i>Smad1</i> , <i>Smad5</i> ou <i>Smad8</i> au niveau de l'épithélium intestinal.....	53
Figure 13. Impact de la délétion de <i>Smad1</i> , <i>Smad5</i> ou <i>Smad8</i> sur l'architecture de l'axe crypte-villosité .....	55
Figure 14. Impact de la délétion de <i>Smad1</i> sur la prolifération de l'épithélium intestinal ...	57
Figure 15. Expression des marqueurs de cellules souches épithéliales intestinales chez les souris <i>Smad1</i> <sup>ΔCEI</sup> .....	58
Figure 16. Augmentation du niveau protéique de la cycline D1 suite à la délétion de <i>Smad1</i> .....	59
Figure 17. Impact de la délétion de <i>Smad1</i> , <i>Smad5</i> ou <i>Smad8</i> sur la vitesse de migration des cellules épithéliales intestinales .....	61
Figure 18. Implication de <i>Smad5</i> dans la réorganisation du cytosquelette d'actine.....	63
Figure 19. Impact de la délétion de <i>Smad1</i> ou de <i>Smad5</i> sur la différenciation des cellules caliciformes.....	65



Figure 20. Impact de <i>Smad1</i> et <i>Smad5</i> sur l'ultra structure des cellules caliciformes .....	66
Figure 21. La délétion individuelle de chaque BR-Smad n'affecte pas la détermination et la différenciation des cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal .....	68
Figure 22. Impact de la délétion de <i>Smad1</i> sur la différenciation des cellules de Paneth ....	69
Figure 23. Impact de la délétion de <i>Smad1</i> sur l'ultra structure des cellules de Paneth .....	70
Figure 24. Génération de populations stables de cellules IEC-6 exprimant un shARN dirigé contre chacun des BR-Smad .....	72
Figure 25. La diminution de <i>Smad5</i> entraîne une augmentation de la migration des cellules IEC-6.....	74
Figure 26. Implication de <i>Smad5</i> dans l'initiation de la migration cellulaire des cellules IEC-6.....	75
Figure 27. La diminution de <i>Smad1</i> entraîne une augmentation de la prolifération chez les cellules IEC-6 .....	76
Figure 28 : Augmentation de la vitesse de polymérisation par la cofiline .....	82

## Liste des tableaux

Tableau 1. Séquences de liaison à l'ADN des différents Smads .....	11
Tableau 2. Lignées de souris utilisées .....	25
Tableau 3. Croisements des lignées de souris utilisées .....	26
Tableau 4. Informations relatives au génotypage par PCR .....	28
Tableau 5. Préparation des tissus en vue de l'inclusion dans la paraffine.....	29
Tableau 6. Liste et dilution des anticorps primaires utilisées en immunofluorescence.....	30
Tableau 7. Amorces utilisées en PCR quantitatif ou semi-quantitatif.....	37
Tableau 8. Liste des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage .....	40
Tableau 9. Récapitulatif des phénotypes observés suite à la délétion de <i>Smad1</i> , <i>Smad5</i> ou <i>Smad8</i> en comparaison avec les phénotypes des souris <i>Bmpr1a</i> .....	71

## **Liste des abréviations**

ActR : Activin type receptor  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ALK : Activin like kinase  
APC: Adenomatosis polyposis coli  
ARN : Acide ribonucléique  
AR-Smad: Activin receptor regulated Smad  
ATCC: American Type Culture Collection  
BAMBI : BMP and activin membrane bound inhibitor  
Bmi1: B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog  
Bmp: Bone morphogenetic protein  
Bmpr: Bone morphogenetic protein receptor  
Bmpr1a: Bone morphogenetic protein receptor type 1a  
BmprII: Bone morphogenetic protein receptor type II  
BrdU: Bromodéoxyuridine  
BRE: Bmp responsive element  
BR-Smad : Bone morphogenetic receptor regulated Smad  
BSA : Bovine Serum Albumin  
CaCl<sub>2</sub>: Chlorure de calcium  
CBC: Crypt base columnar cell  
CBP/p300: CREB binding protein  
Cdc-42: Cell division cycle 42  
Cdk : Cyclin dependant kinase  
Cdx2 : caudal type homeo box transcription factor 2  
CEI: cellule épithéliale intestinal  
CgA: Chromogranine A  
Co-Smad: Common mediator Smad  
Cre: cyclization recombinase  
DEPC: Diéthyl pyrocarbonate

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium  
 dNTP: Déocynucléotides triphosphates  
 DTT: Dithiothreitol  
 ECL: Enhanced Chemiluminescence  
 EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid  
 Eps15R : epidermal growth factor receptor pathway substrate 15  
 FBS: Fetal bovine serum  
 FITC: Fluorescein isothiocyanate  
 GPI : Glycosyl phosphatidyl inositol  
 Gsk-3 $\beta$  : glycogen synthase kinase 3 beta  
 H & E: Hématoxyline et éosine  
 HEPES: N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethane Sulfonic Acid  
 Hh: Hedgehog  
 Hnf-4 $\alpha$ : Hepatocyte nuclear factor 4alpha  
 IEC-6: Intestinal epitheloid cells line No 6  
 I-Smads: Inhibitory Smads  
 JNK: c-Jun N-terminal kinase  
 Klf4: Kruppel-like factor 4  
 Lgr5: Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5  
 LiCl : Chlorure de lithium  
 Limk: Lim kinase  
 loxP: Locus of crossing over of P1 bacteriophage  
 MAD : Mothers agaisnt decapentaplegic  
 MAPK : Mitogen activated protein kinase  
 MgCl<sub>2</sub>: Chlorure de magnésium  
 MH1 et 2 : MAD homology domain 1 et 2  
 MIN: Multiple intestinal neoplasia  
 MMP-7: Matrix metallopeptidase 7  
 Muc2 : Mucine 2  
 Mx1 : Myxovirus resistance 1  
 NaCl: Chlorure de sodium  
 Opti-MEM : Modification of DMEM media

Pbgd: Porphobilinogen deaminase  
PBS : Phosphate buffered saline  
PBT: PBS-BSA-Triton  
PCR : Polymerase chain reaction  
PFA : Paraformaldéhyde  
PIC: Protease inhibitory cocktail  
PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase  
PKC: protein kinase C  
PMSF: Phenylmethanesulfonyl fluoride  
PolyI:C : acide polyinosinic polycytidylic  
PP2A: Protéine phosphatase 2A  
PVDF: Polyvinylidene difluoride  
Rac1 : RAS-related C3 botulinum substrate 1  
Rb: retinoblastoma protein  
RhoA: Ras homolog gene family, member A  
R-Smads: Receptor regulated Smads  
RT: Reverse Transcriptase  
SAD: Smad activating domain  
SBE: Smad Binding Element  
shRNA: Small hairpin ribonucleic acid  
Sma: Small body size  
Smad: contraction de Sma (*C. Elegans*) et Mad (*Drosophila*)  
Smurf: Smad ubiquitination regulatory factor  
Sox9: SRY-box containing gene 9  
Tcf: T-cell factor  
Tff3: trefoil factor 3  
Tgf- $\beta$ : Transforming growth factor  $\beta$   
Tgf- $\beta$ r: Transforming growth factor  $\beta$  receptor  
Trb3: tribbles homolog 3  
Wif1: Wnt inhibitory factor 1  
Wnt: Wingless-related MMTV integration site

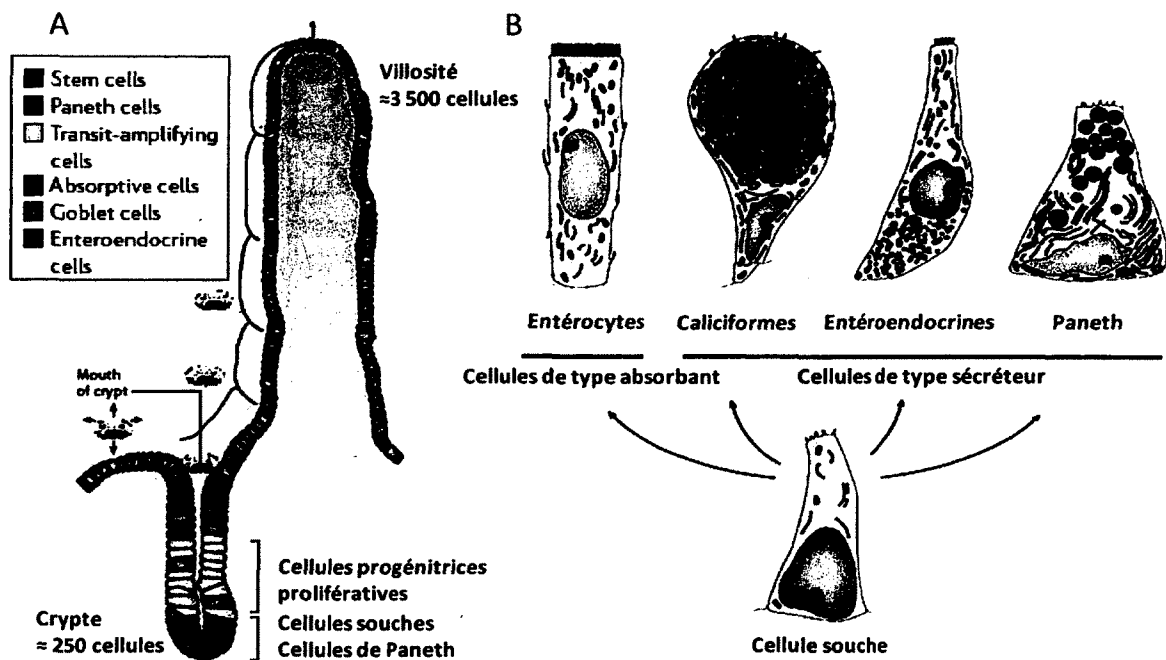
## **I. Introduction**

### **1.1 L'intestin grêle**

La digestion et l'absorption des nutriments s'effectuent principalement au niveau de l'intestin grêle situé entre l'estomac et le côlon. L'intestin grêle est subdivisé en trois régions : le duodénum, le jéjunum et l'iléon. C'est dans le duodénum que le bol alimentaire est mélangé avec les sucs enzymatiques du pancréas. Le jéjunum est le centre principal de l'absorption des nutriments, alors que l'iléon est responsable de l'absorption des sels biliaires et le côlon, quant à lui, est responsable de l'absorption de l'eau et des électrolytes. L'absorption de ces molécules est médiée par la muqueuse intestinale et plus précisément par l'épithélium de surface qui la recouvre. En plus de l'absorption, cet épithélium possède des enzymes au niveau de la bordure en brosse permettant la digestion du bol alimentaire. L'épithélium permet également la protection de l'organisme en formant une barrière physique bloquant l'entrée des microorganismes présents au sein du tube digestif.

### **1.2 L'axe crypte-villosité**

L'unité fonctionnelle de l'intestin grêle est l'axe crypte-villosité. Les villosités sont des invaginations de la muqueuse dans la lumière intestinale permettant d'augmenter la surface en contact avec le bol alimentaire, alors que les cryptes de Lieberkühn sont des exvaginations entre les villosités (Figure 1A). Les cellules souches épithéliales intestinales, situées à la base des cryptes, vont donner naissance à tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal, dont les quatre principaux : Paneth, caliciformes, entéroendocrines et les entérocytes. Les cryptes contiennent, en plus des cellules souches intestinales, les cellules progénitrices prolifératives et les cellules de Paneth, alors que l'épithélium des villosités est composé des cellules entéroendocrines, caliciformes et entérocytaires (Figure 1 B).



**Figure 1. Architecture de l'axe crypte-villosité et principaux types cellulaires composant son épithélium**

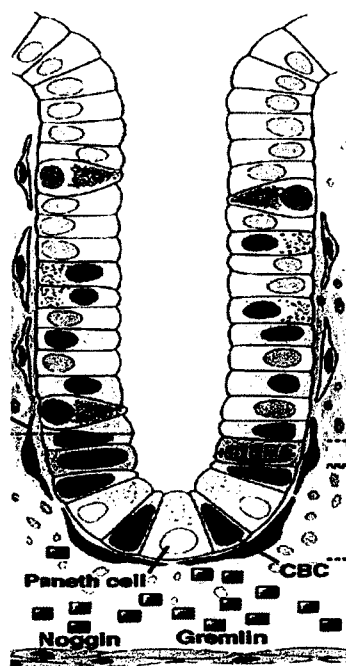
Représentation de l'architecture de l'axe crypte-villosité de l'intestin et de la répartition des cellules composant chaque compartiment (A). Les principaux types cellulaires de l'épithélium dérivés des cellules souches sont présentés en (B). Figure adaptée de Crosnier *et al.*, 2006.

### 1.3 L'épithélium intestinal

#### 1.3.1 Les cellules souches

Au niveau de l'épithélium intestinal, on retrouve deux types de cellules souches. Les cellules souches CBC (crypt base columnar cell) situées à la base des cryptes intercalées entre les cellules de Paneth (Cheng et Leblond, 1974b) et les cellules souches en position +4 (Potten *et al.*, 1974) (Figure 2). Les cellules souches CBC sont Lgr5+ (Barker *et al.*, 2007) alors que les cellules en position +4 sont Bmi1+ (Sangiorgi et Capecchi, 2008). Ces deux types des cellules souches peuvent générer tous les types de cellules épithéliales

retrouvés au sein de l'axe crypte-villosité (Cheng et Leblond, 1974b; Barker *et al.*, 2007; Sangiorgi et Capecchi, 2008). Par contre, les cellules souches CBC prolifèrent beaucoup plus rapidement que les cellules souches en position +4 suggérant que ces dernières soient des cellules souches quiescentes alors que les CBC seraient les cellules souches actives (Barker *et al.*, 2007; Sangiorgi et Capecchi, 2008). De plus, les cellules CBC sont retrouvées tout le long de l'axe rostro-caudal de l'intestin (duodénum – côlon) (Barker *et al.*, 2007) tandis que les cellules souches en +4 ne sont retrouvées que dans le duodénum et le jéjunum (Sangiorgi et Capecchi, 2008). Il n'est pas encore clair si ces deux types de cellules souches représentent deux populations différentes ou deux sous-populations.



**Figure 2. Localisation des cellules souches épithéliales intestinales**

Localisation des deux types de cellules souches de l'épithélium intestinal. Les cellules CBC (Lgr5+) (vert pâle) sont situées à la base des cryptes entre les cellules de Paneth alors que les cellules Bmi1+ (turquoise) sont situées en position +4 de la crypte intestinale. Figure tirée de Scoville *et al.* 2008.



### 1.3.2 Cellules progénitrices prolifératives

L'épithélium de l'intestin est renouvelé en 3 à 5 jours chez la souris dépendamment des types cellulaires (Cheng et Leblond, 1974b). Ce renouvellement implique une prolifération cellulaire constante ce qui nécessite un contrôle accru pour empêcher le développement de la carcinogenèse. Au niveau de l'épithélium intestinal, en plus des cellules souches, on retrouve les cellules progénitrices prolifératives (Cheng et Leblond, 1974a). Les cellules progénitrices prolifératives entament plusieurs cycles de division rapide permettant ainsi d'augmenter le nombre de cellules épithéliales issu de la réplication d'une cellule souche. Les cellules progénitrices prolifératives migrent vers la surface des cryptes où elles reçoivent des signaux les amenant à se différencier. Ces cellules permettent de limiter les divisions effectuées par les cellules souches diminuant ainsi les chances d'acquérir des mutations au sein des cellules souches suite à une erreur de réplication (Scoville *et al.*, 2008). Si une mutation survient vers le haut des cryptes, les cellules seront exfoliées dans la lumière intestinale avant de devenir problématiques pour l'organisme.

### 1.3.3 Cellules épithéliales différenciées

Les cellules épithéliales se différencient pleinement au niveau supérieur de la crypte avant de continuer à migrer le long de la villosité à l'exception des cellules de Paneth qui entameront une migration descendante et iront se loger au fond des cryptes. Les cellules épithéliales sont par la suite exfoliées dans la lumière intestinale une fois rendue au sommet de la villosité. Les cellules de Paneth, situées à la base des cryptes, sécrètent des molécules antimicrobiennes telles que des lysozymes et des défensines (Scoville *et al.*, 2008). Les cellules entéroendocrines sont responsables de la sécrétion de diverses hormones dans la circulation sanguine (Scoville *et al.*, 2008) alors que les cellules caliciformes libèrent du mucus permettant au bol alimentaire de glisser et permet également de former une couche protectrice de mucus sur l'épithélium empêchant ainsi les bactéries d'être en contact direct et d'adhérer avec l'épithélium (Scoville *et al.*, 2008). Les entérocytes ou cellules absorbantes sont des cellules dont la fonction principale est l'absorption des nutriments.

Ces cellules possèdent à leur côté apical plusieurs projections (microvillosités) formant une bordure en brosse ce qui permet aux cellules d'augmenter la surface de contact avec la lumière intestinale et donc avec les nutriments. Les entérocytes sont le type cellulaire le plus abondant au sein de l'épithélium intestinal ( $\approx 86\%$ ) (Cheng et Leblond, 1974a).

#### **1.3.4 Rôle de barrière physique**

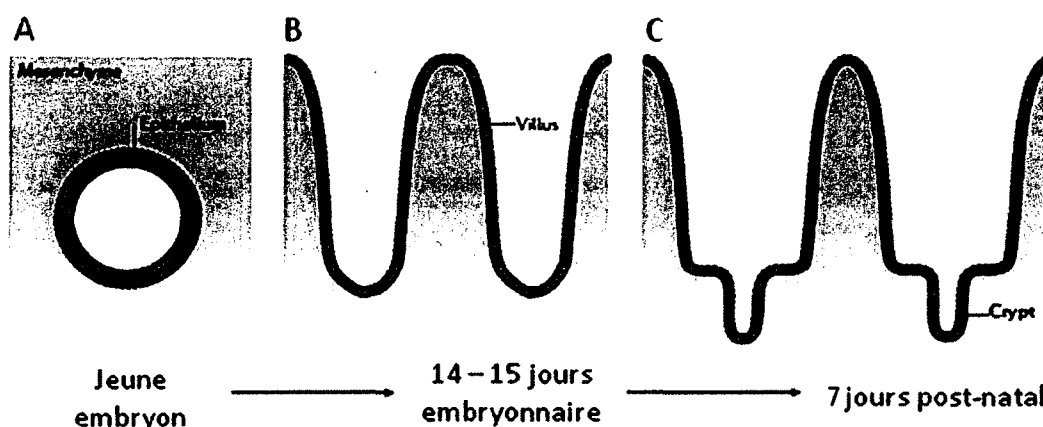
L'épithélium intestinal joue également un rôle très important de barrière physique étanche empêchant les microorganismes, qui composent la microflore intestinale, d'entrer dans la muqueuse et la sous-muqueuse. Les jonctions serrées des cellules épithéliales permettent aux cellules de contrôler l'étanchéité entre les cellules. Des défauts au niveau de ces jonctions et de leur étanchéité peuvent entraîner l'entrée de microorganismes dans la muqueuse et la sous-muqueuse et créer ainsi des situations inflammatoires.

#### **1.4 Développement et morphogénèse de l'axe crypte-villosité chez la souris**

Chez la souris, le tube digestif primitif origine de l'endoderme primitif et il est composé d'un épithélium pluristratifié chez le jeune embryon (avant le jour embryonnaire 14). Les villosités se forment autour du jour embryonnaire 14,5 et l'épithélium intestinal forme alors une monocouche de cellule. Les cellules prolifératives sont dès lors retrouvées dans les régions intervillositaires, car les cryptes ne se formeront pas avant 5 à 7 jours suivant la naissance des souriceaux (Figure 3) (Crosnier *et al.*, 2006).

Les communications épithélio-mésenchymateuses sont essentielles à la formation et la compartimentalisation de l'axe crypte-villosité. Parmi les voies impliquées dans ces communications bidirectionnelles, on retrouve la voie des Hedgehogs (Hh) et la voie des Bone morphogenetic proteins (Bmps). Les Hedgehogs sont sécrétés par l'épithélium tandis que leur récepteur est situé au niveau des cellules mésenchymateuses (Madison *et al.*,

2005). L'activation de la voie Hh au niveau du mésenchyme régule et active les Bmps ce qui crée un feedback du mésenchyme vers l'épithélium (Madison *et al.*, 2005).



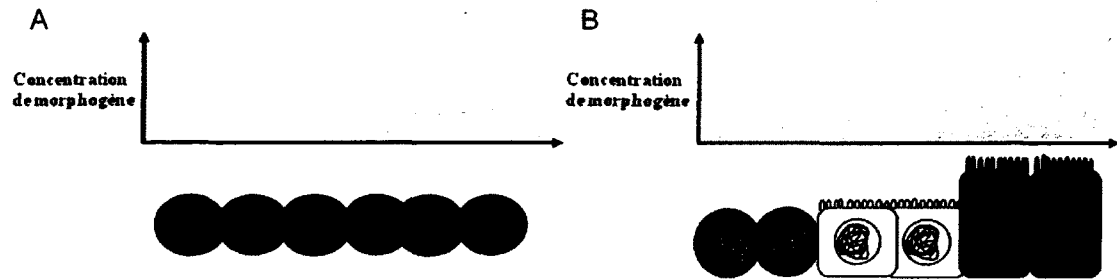
**Figure 3. Morphogenèse de l'axe crypte-villosité**

Chez le jeune embryon de souris, l'épithélium intestinal est pluristratifié (A). À partir du jour embryonnaire 14,5, les villosités se forment dans la lumière intestinale et l'épithélium devient alors une monocouche de cellule. Les villosités sont composées de cellules non prolifératives et différenciées (bleu) alors que les régions intervillositaires sont composées de cellules prolifératives et indifférenciées (rouge) (B). 7 jours après la naissance, les régions intervillositaires sont invaginées dans la sous-muqueuse formant ainsi les cryptes de Lieberkühn (C). Figure adaptée de Crosnier *et al.*, 2006.

### 1.5 Les Bmps

La voie des Bone morphogenetic proteins (Bmps) appartient à la superfamille du TGF- $\beta$ . Ils ont été d'abord identifiés, comme leur nom le mentionne, par leur capacité à induire la formation d'os et de cartilages ectopiques (Urist, 1965) et caractérisés vers la fin des années 80 (Wozney *et al.*, 1988, Luyten *et al.*, 1989). Il a par la suite été démontré qu'ils étaient impliqués dans plusieurs processus cellulaires autant chez l'embryon que chez l'adulte et ce au niveau de tout l'organisme (Massagué, 1998). Les Bmps sont sécrétés sous forme active et ne nécessitent pas d'étape de maturation. Les Bmps sont des morphogènes agissant sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère augmentant ainsi la versatilité des réponses cellulaires induites. Un morphogène est une molécule ayant différents effets sur

des cellules de même type selon sa concentration (Figure 4) et retrouvé sous forme d'un gradient de concentration au sein d'un tissu.

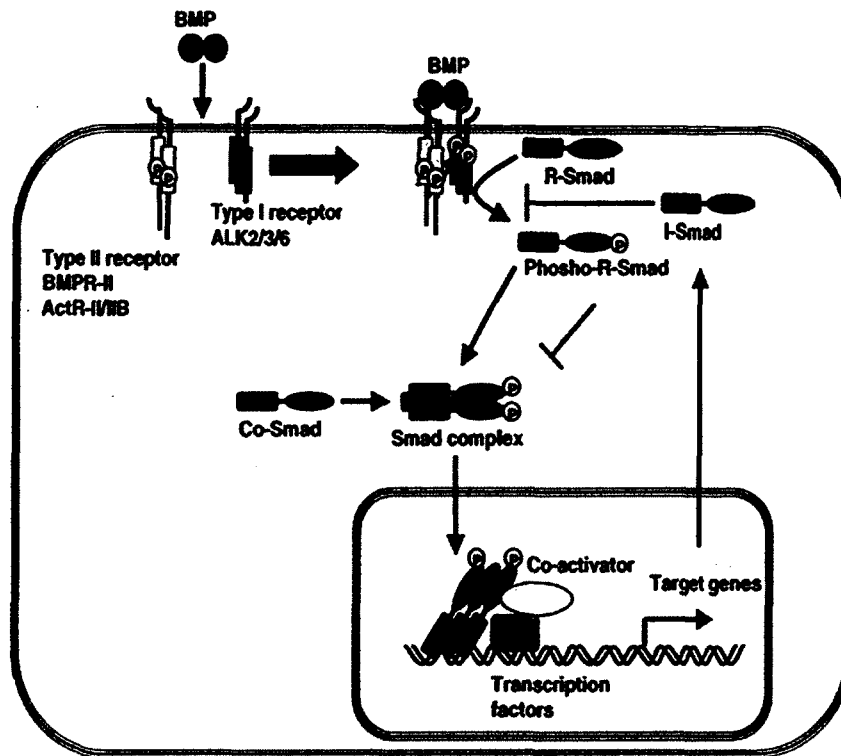


**Figure 4. Impact de différentes concentrations d'un morphogène sur des cellules de même type**

Des cellules de même type sont exposées à un gradient de morphogène (A). Différentes concentrations n'entraîneront pas les mêmes réponses cellulaires (B).

### 1.5.1 La voie de signalisation des Bmps

Le dimère de Bmps est reconnu par les récepteurs de type I et II ce qui entraîne un changement de conformation des récepteurs libérant le domaine kinase du récepteur de type II. Le récepteur de type II s'autophosphoryle et phosphoryle subséquentement le récepteur de type I. Le récepteur de type I peut alors phosphoryler et activer les BR-Smads. Une fois activés, les BR-Smads forment un trimère avec le Co-Smad (Smad4) et transloque au noyau pour y activer ou réprimer la transcription de certains gènes cibles. Parmi ces gènes cibles, on retrouve plusieurs éléments qui inhibent la voie des Bmps permettant ainsi la création d'une boucle de rétro-inhibition de la voie (Figure 5).



**Figure 5. Schématisation de la voie de signalisation des Bmps**

Le dimère de Bmps lie les récepteurs des Bmps de type I et II ce qui induit un changement de conformation des récepteurs. Le récepteur de type II peut alors phosphoryler le récepteur de type I. Ce dernier peut alors phosphoryler le BR-Smad (Smad 1, 5 et 8). Une fois phosphorylés, les BR-Smads forment un hétérocomplexe avec Smad4 (Co-Smad) et transloque au noyau où ils peuvent interagir avec divers cofacteurs pour moduler la transcription de gènes cibles. Parmi ces gènes cibles, on retrouve les I-Smads permettant ainsi de créer une boucle de rétro-inhibition de la voie. Figure modifiée de Miyazono *et al.*, 2005.

### 1.5.2 Les récepteurs

Les récepteurs de la superfamille du TGF- $\beta$  ont d'abord été nommés ALK (Activin receptor-like kinases). Ils ont été par la suite nommés en fonction de leurs ligands principaux (Tgfb $\beta$ r, Bmpr, ActR). Les ligands Bmps se lient de façon coopérative aux récepteurs de type I et II à la surface des cellules et la présence de ces deux types de récepteurs est essentielle à la signalisation (Massagué, 1998). Pour la voie des Bmps, il

existe trois récepteurs de type I (Bmpr1a (ALK3), 1b (ALK6) et ActR1 (ALK2)) et trois récepteurs de type II (BmprII, ActRIIa et IIb) (Massagué, 1998). Les récepteurs Bmpr1a et BmprII sont les récepteurs présents dans la muqueuse intestinale (Auclair *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Le récepteur de type I est impliqué dans la liaison et la phosphorylation des R-Smads alors que le récepteur de type II est responsable de l'activation du récepteur de type I. De plus, le récepteur de type II possède un long domaine cytoplasmique qui permet l'interaction avec diverses protéines. Il peut interagir avec entre autres Trb3, la Limk, la PP2A, la Cavéoline, Eps15R et Dullard (Sieber *et al.*, 2009). Lorsque le récepteur de type II est lié à son ligand, Trb3 se dissocie du récepteur et ubiquitine Smurf1 qui est ensuite dégradé par le protéasome ce qui permet de potentialiser la signalisation intracellulaire (Chan *et al.*, 2007). La Limk est une protéine impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine qui inhibe la dépolymérisation des filaments d'actine via l'inhibition de la cofiline (Foletta *et al.*, 2003). La protéine phosphatase 2A (PP2A) se dissocie du récepteur de type II lorsque celui-ci lie son ligand et déphosphoryle le domaine linker des BR-Smads permettant ainsi de potentialiser la signalisation intracellulaire (Bengtsson *et al.*, 2009). Dans certaines circonstances, la PP2A peut également déphosphoryler les BR-Smads sur la queue C-terminal ce qui inhibe la signalisation (Bengtsson *et al.*, 2009). L'interaction de la Caveolin avec le récepteur de type II est impliquée dans la signalisation Smad indépendante, mais permet le recyclage de ce dernier à la membrane plasmique (Hartung *et al.*, 2006; Wertz et Bauer, 2008). Eps15R est une molécule qui compose le manteau de clathrin impliqué lors de l'endocytose des récepteurs (Hartung *et al.*, 2006). La protéine Dullard, quant à elle, est responsable de l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome des récepteurs de type I et II (Satow *et al.*, 2006).

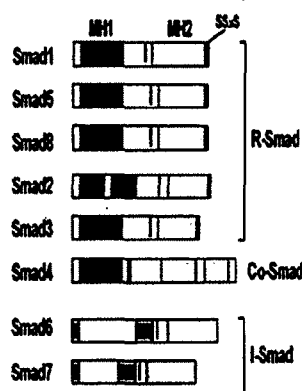
### 1.5.3 Les Smads

Le nom Smad chez les mammifères est la contraction des noms de cette protéine chez *C. elegans* (Sma) et chez la drosophile (Mad). Chez les mammifères, on retrouve 8 Smads au total : les Smads 2 et 3 sont activés par le Tgf- $\beta$  et les Activines (AR-Smads); les Smads 1, 5 et 8 sont activés par les Bmps (BR-Smads) ; Smad 4 est un Smad commun aux

deux voies (Co-Smad) alors que les Smads 6 et 7 sont des Smads inhibiteurs de la voie (I-Smads) (Massagué, 1998).

## 1.6 Les domaines des Smads

Les AR-Smads, les BR-Smads et le Co-Smad sont composés de trois domaines : le domaine MH1, le linker et le domaine MH2 (Figure 6).



**Figure 6. Domaine des divers Smads**

Représentation des domaines composants les différents Smads. Les R-Smads possèdent un motif SSxS (vert lime) (site de phosphorylation par le récepteur de type I). Les R-Smads et le Co-Smad sont composés des domaines : MH1 (rose), une séquence de localisation nucléaire (bleu), une région linker (blanc) et MH2 (jaune) alors que les I-Smads possèdent seulement les domaines linker et MH2. Tous les Smads à l'exception de Smad4 comportent un motif PY (orange) (site liaison pour les E3 ubiquitine ligase). Smad4 est le seul Smad à posséder une séquence d'export nucléaire (vert). Figure de modifiée de Nishimura *et al.*, 2003.

### 1.6.1 Le domaine MH1 et l'ADN

Le domaine MH1 est responsable de la liaison à l'ADN et de l'interaction avec certains cofacteurs. Les Smads lient des séquences promotrices riches en GC. Smad 3 et Smad4 lient la séquence consensus appelé SBE (Smad binding element) AGAC ou sa

séquence complémentaire GTCT (Dennler *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 1998; Zawel *et al.*, 1998) alors que les Smads de la voie des Bmps lient le BRE (Bmp responsive element) qui est une région très riche en GC (Tableau 1) (Ishida *et al.*, 2000; Katagiri *et al.*, 2002; Korchynskyi et Dijke, 2002; Lopez-Rovira *et al.*, 2002).

**Tableau 1. Séquences de liaison à l'ADN des différents Smads**

	Smad 3 et 4 (SBE)	Smad 1, 5 et 8 (BRE)
Séquence promotrice liée	AGAC ou GTCT	GGCGCC ou GCCGCGCC
Séquences flanquantes	---	CGCC et CAGC

La liaison des Smads à l'ADN est faible, l'interaction Smad-ADN nécessite plusieurs sites de liaison de Smads, mais surtout requiert la présence de cofacteurs pour solidifier la liaison et optimiser l'activation ou la répression transcriptionnelle médiée par les Smads. Les séquences flanquantes ne sont pas nécessaires à la transcription induite par les BR-Smads, mais augmentent et potentialisent leur activité transcriptionnelle (Korchynskyi et Dijke, 2002; Nakahiro *et al.*, 2010).

Le domaine MH1 de Smad2 possède une insertion de 30 nucléotides dans la région responsable de la liaison à l'ADN ce qui rend impossible sa liaison directe avec l'ADN (Shi *et al.*, 1998). Toutefois, la délétion de Smad2 chez la souris est létale au niveau embryonnaire (Nomura et Li, 1998; Weinstein *et al.*, 1998), démontrant que même s'il ne lie pas directement l'ADN, il est capable de moduler l'activité transcriptionnelle de ces gènes cibles via Smad4, mais surtout via l'interaction avec ses cofacteurs et son domaine MH2.



L'interaction avec les cofacteurs et leur disponibilité selon le contexte cellulaire affectent l'activité transcriptionnelle des Smads. Les contextes cellulaires incluent le type cellulaire, le stade de différenciation, les communications croisées avec d'autres voies et les conditions environnantes (homéostasie vs stress).

### 1.6.2 Le domaine linker et la régulation des R-Smads

Le domaine linker est la région située entre les deux domaines MH. En plus d'un rôle conformationnel, la région du linker est impliquée dans la régulation de l'activité et la dégradation des Smads. Cette région comporte plusieurs sites de phosphorylation pour les Mapk et Gsk-3 $\beta$  (Kretzschmar *et al.*, 1997, Sieber *et al.*, 2009). Les facteurs de croissance et les facteurs de stress via Erk2 ou p38 et Jnk respectivement peuvent phosphoryler le linker des R-Smads ce qui a pour conséquence d'attirer Smurf1. Les Smads sont alors soit retenus au niveau du cytoplasme ou poly-ubiquitinés et dégradés par le protéasome 26S (Zhu *et al.*, 1999, Sapkota *et al.*, 2007). Des études subséquentes du même groupe ont permis de démontrer que la phosphorylation du linker avait un rôle positif pour l'activité transcriptionnelle des Smads et le contrôle de la signalisation médiée par les Smads (Alarcon *et al.*, 2009, Aragon *et al.*, 2011). Ils ont démontré que Smad1 pouvait être phosphorylé sur la région linker au niveau nucléaire par Cdk8 et Cdk9 ce qui permettait la liaison de co-facteur et ainsi d'augmenter l'activité transcriptionnelle des Smads (Alarcon *et al.*, 2009). Par la suite, il a été démontré que ces phosphorylations par les Cdk8/9 entraînaient la phosphorylation du linker par la Gsk-3 $\beta$ . Cette deuxième étape de phosphorylation diminuait l'affinité du co-facteur pour le linker alors que l'affinité pour Smurf1 augmentait ce qui entraînait l'ubiquitination de Smad1, l'arrêt de la transcription et finalement la dégradation de Smad1 par le protéasome (Aragon *et al.*, 2011). Ces travaux ont permis de mettre en évidence un code de phosphosérines sur le domaine linker permettant une fine régulation des voies du Tgf- $\beta$  et des Bmps ainsi qu'une communication croisée avec les voies Mapk et Wnt. La région linker de Smad4 possède un domaine SAD (Smad4 activating domain) qui est essentiel à l'activation de la transcription via son interaction avec p300 (de Caestecker *et al.*, 2000).

### 1.6.3 Le domaine MH2 et les interactions protéine-protéine

Le domaine MH2 est responsable des interactions protéine-protéine. Le domaine MH2 est lié au domaine MH1 lorsque le Smad est sous sa forme inactive (Massagué, 1998). Cette interaction est perdue suite à la phosphorylation de la queue C-terminale par le récepteur de type I. Le domaine MH2 des R-Smads est également responsable de la liaison du Smad au récepteur de type I, permettant ainsi la phosphorylation du Smad par ce dernier. Ce domaine permet aussi l'interaction avec le Co-Smad, avec les nucléoporines et avec les différents cofacteurs (Shi et Massagué, 2003).

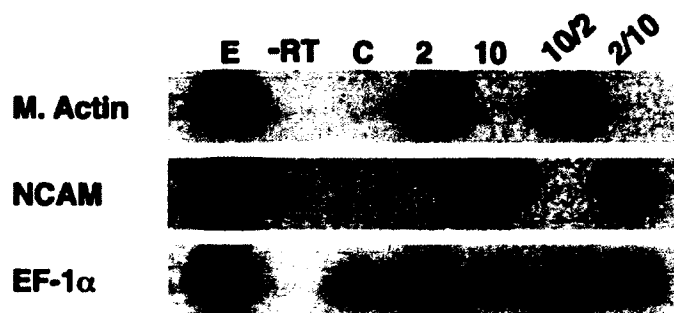
Le domaine MH2 des Smads permet également la spécificité des gènes cibles transcrits via les interactions avec les différents cofacteurs, qui eux peuvent varier d'un contexte cellulaire à un autre. Une étude chez le Xénope a démontré cette spécificité médiée par le domaine MH2 des Smads. Les auteurs ont généré des chimères de Smad en échangeant le domaine MH2 de Smads du mésoderme avec celui de Smads impliqués dans la différenciation neuronale. Les gènes induits par ces chimères sont les gènes cibles du MH2 parental démontrant l'importance du domaine MH2 et l'interaction avec les cofacteurs dans la spécificité des gènes cibles induits (Figure 7) (Fortuno *et al.*, 2001).

## 1.7 Régulation de la voie des Bmps

### 1.7.1 Les I-Smads

Chez les mammifères, il existe deux I-Smads : Smad6 inhibe seulement la voie des Bmps (Hata *et al.*, 1998) alors que Smad7 peut inhiber autant la voie du Tgf- $\beta$  que la voie des Bmps (Hayashi *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997). Smad6 est une cible transcriptionnelle des Bmps (Ishida *et al.*, 2000; Takase *et al.*, 1998) alors que Smad7 est un gène cible des deux voies (Benchabane et Wrana, 2003; Nakao *et al.*, 1997) permettant ainsi de créer une boucle de rétro-inhibition de ces voies de signalisation. Smad6 inhibe la voie des Bmps en

liant les BR-Smads activés ce qui empêche leur liaison avec Smad4 et leur translocation au noyau (Hata *et al.*, 1998). Smad7 inhibe les voies du Tgf- $\beta$  et des Bmps en liant les récepteurs de type I activé. La liaison de Smad7 au récepteur de type I empêche l'activation des R-Smads (Hayashi *et al.*, 1997; Nakao *et al.*, 1997) et permet le recrutement de Smurf2 au niveau des récepteurs (Kavsak *et al.*, 2000).



**Figure 7. Le domaine MH2 est responsable de la spécificité des gènes cibles induits par les Smads**

PCR semi-quantitatif sur des extraits d'embryon de Xenope possédant diverses constructions de chimère de Smad. *M. actin* est un gène cible de Smad2 alors que *NCAM* est un gène cible de Smad10. *EF-1 $\alpha$*  est utilisé comme contrôle de chargement. Les gènes induits par les constructions chimériques de Smad correspondent aux gènes cibles du MH2 parental. E : embryon, -RT : pas d'ADNc, C : embryon sans construction de Smad, 2 : expression de Smad2 (mésoderme), 10 : expression de Smad10 (neuronal), 10/2 : chimère possédant le MH1 de Smad10 et le MH2 de Smad2, 2/10 : chimère possédant le MH1 de Smad2 et le MH2 de Smad10 (Fortuno *et al.*, 2001).

### 1.7.2 Les Smurfs

Les Smurfs (Smad ubiquitination regulatory factors) sont des E3 ubiquitine ligase et ils sont impliqués dans la régulation de la voie des Bmps et du Tgf- $\beta$  (Zhu *et al.*, 1999; Kavsak *et al.*, 2000). Smurf1 est impliqué dans la l'ubiquitination des BR-Smads ce qui mène à la rétention des BR-Smads dans le cytoplasme ou à la dégradation par le protéasome (Zhu *et al.*, 1999; Sapkota *et al.*, 2007). Smurf2 est, quant à lui, impliqué dans

l'ubiquitination et la dégradation des récepteurs de type I du Tgf- $\beta$  et des Bmps. Smurf2, ne pouvant pas lier directement les récepteurs de type I, nécessite la présence de Smad7 qui peut lier les récepteurs de type I pour permettre l'ubiquitination des récepteurs de type I par Smurf2 (Kasvak *et al.*, 2000).

### 1.7.3 Les antagonistes extracellulaires des Bmps

Il existe plusieurs antagonistes des Bmps qui peuvent se lier aux dimères de Bmps les empêchant ainsi de lier les récepteurs de type I et II. Parmi les antagonistes des Bmps, Noggin, Chordin, Gremlin et Twisted gastrulation sont ceux retrouvés principalement au niveau de la muqueuse intestinale (Li *et al.*, 2007). De plus, l'expression de ces antagonistes est, pour la plupart, augmentée suite à l'activation de la voie des Bmps créant une boucle de rétro-inhibition de la voie.

### 1.7.4 Pseudo récepteur

BAMBI (Bmp and activin membrane bound protein) est un pseudo récepteur de type I. Cette protéine transmembranaire est similaire au récepteur de type I, mais ne possède pas de domaine kinase au niveau du cytosol. BAMBI peut donc interagir avec le récepteur de type II et lier le ligand, mais n'entraîne aucune cascade de signalisation intracellulaire (Onichtchouk *et al.*, 1999). L'expression de BAMBI est régulée positivement par les Bmps, le Tgf- $\beta$  et la voie de Wnt (Sekiya *et al.*, 2004; Sekiya *et al.*, 2004b).

### 1.7.5 Corécepteurs

Dragon et RGMa (repulsive guidance molecules) sont deux corécepteurs des Bmps. Ils sont accrochés à la membrane plasmique externe à l'aide d'une ancre GPI (glycosyl phosphatidyl inositol) et interagissent avec le récepteur de type I favorisant la liaison du

ligand et potentialisant la signalisation intracellulaire (Babitt *et al.*, 2005; Samad *et al.*, 2005).

## 1.8 Patron d'expression des divers BR-Smads chez la souris

En effectuant des hybridations *in situ* contre l'ARNm des BR-Smads ou en utilisant le gène rapporteur de la  $\beta$ -galactosidase, différents groupes de recherche ont analysé les patrons d'expression des *Smad 1*, *5* ou *8* chez l'embryon de souris. *Smad1* et *Smad5* sont exprimés fortement autant au niveau de l'embryon que des membranes extra-embryonnaires alors que *Smad8* est exprimé plus faiblement et seulement au niveau de l'endoderme viscéral (Chang *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2006). *Smad8* est exprimé par la suite au niveau des poumons, du cœur, de l'épithélium rénal et de la prostate. Au niveau de l'intestin, *Smad8* est retrouvé au niveau de l'épithélium et de la musculaire à 16,5 jours embryonnaire (Arnold *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2009). Chez l'adulte, le patron d'expression des Smads reste semblable, *Smad1* et *Smad5* sont ubiquitaires alors que l'expression de *Smad8* est plus restreinte.

## 1.9 Rôles distinct des BR-Smads chez la souris

### 1.9.1 Délétion classique des BR-Smads

Différents groupes de recherche ont effectué la délétion classique de chaque BR-Smad chez la souris. La délétion classique de *Smad1* entraîne la mort *in utero* au jour embryonnaire 10,5. Les auteurs ont observé au niveau des membranes extra-embryonnaires des défauts dans la formation de l'allantoïde et une hyper-prolifération du chorion. Au niveau de l'embryon, une diminution et même la disparition des cellules germinales primordiales ainsi que des défauts dans la symétrie le long de l'axe proximo-distal ont été observés (Tremblay *et al.*, 2001).

La délétion classique de *Smad5* est également létale entre les jours embryonnaires 9,5 et 11,5. Les auteurs ont observé des défauts dans la formation de l'intestin, du cœur, du tube neural et dans la vascularisation et l'hématopoïèse. Plusieurs défauts ont également été retrouvés au niveau des membranes extra-embryonnaires tels que la vascularisation et le développement de l'amnios (Chang *et al.*, 1999).

La délétion classique de *Smad8*, quant à elle, n'est pas létale. Les souris sont viables et fertiles (Arnold *et al.*, 2006, Huang *et al.*, 2009). Les auteurs ont toutefois remarqué des défauts dans la vascularisation au niveau des poumons accompagnés d'infiltration de cellules inflammatoires à partir de l'âge de 11 mois. Les souris développent par la suite des adénomes pulmonaires après un an. Suite à l'analyse des tumeurs, les auteurs ont pu démontrer que *Smad8* jouait un rôle dans le contrôle de la prolifération au niveau du parenchyme pulmonaire (Huang *et al.*, 2009).

À noter que la létalité de la délétion de *Smad1* ou de *Smad5* est due aux défauts dans la formation inadéquate des membranes extra-embryonnaires empêchant ainsi le développement tardif de l'embryon. De plus, la délétion individuelle de chacun des BR-Smads entraîne des phénotypes différents chez l'embryon de souris suggérant donc que ceux-ci ont des rôles distincts au niveau des différentes fonctions cellulaires.

### **1.9.2 Délétion conditionnelle de *Smad1* ou de *Smad5* au sein de l'épithélium pulmonaire**

Le groupe de Shi a effectué la délétion conditionnelle de *Bmpr1a* dans l'épithélium pulmonaire et avait observé une augmentation de la prolifération et une altération de la différenciation des cellules épithéliales pulmonaire (Sun *et al.*, 2008). Ils ont par la suite effectué la délétion conditionnelle de *Smad1* ou *Smad5* au niveau de l'épithélium pulmonaire afin d'étudier lequel de ces BR-Smads était responsable des différents phénotypes obtenus suite à la délétion de *Bmpr1a* dans ces cellules. Les auteurs ont exclu

*Smad8* de leur étude, car la délétion classique de *Smad8* ne présentait pas de défaut dans la morphogenèse des poumons. Leurs récents travaux ont démontré que Smad1 était le BR-Smad impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire et la différenciation de l'épithélium pulmonaire (Xu *et al.*, 2011). Cette étude démontrait également que *Wif1* (*Wnt inhibitory factor 1*) était un gène cible direct de Smad1 illustrant une fois de plus la communication croisée entre la voie des Bmps et la voie Wnt.

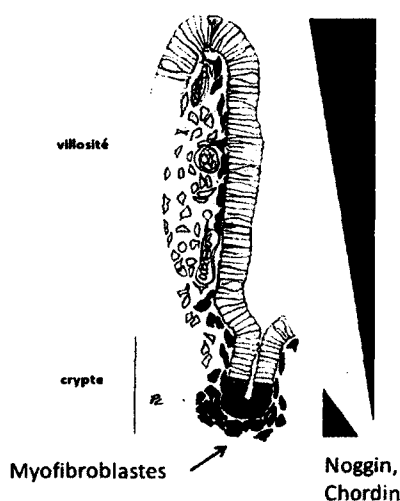
### 1.10 Les Bmps au niveau de l'intestin

Il a été démontré qu'au niveau de l'intestin murin, les éléments de la voie de signalisation (ligands, récepteurs et BR-Smads) sont exprimés par l'épithélium et le mésenchyme (Li *et al.*, 2007). Les récepteurs Bmpr1a et BmprII sont les récepteurs les plus présents dans la muqueuse intestinale (Auclair *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Les Bmps présents au niveau de l'intestin sont les Bmps 2, 4 et 7. Les Bmps forment un gradient croissant le long de l'axe crypte-villosité (Figure 8) (Scoville *et al.*, 2008). Un gradient d'antagonistes des Bmps, sécrétés par les myofibroblastes sous-épithéliaux, est retrouvé au fond des cryptes et est impliqué dans le maintien de la niche des cellules souches.

#### 1.10.1 Surexpression de *Noggin* au niveau de l'intestin

Plusieurs groupes de recherche se sont intéressés aux rôles de la voie des Bmps au sein de l'intestin en utilisant des approches différentes. Le groupe de Clevers a généré une souris surexprimant *Noggin*, un antagoniste des Bmps, sous le contrôle du promoteur tronqué de la *Villine* (Pinto *et al.*, 1999) permettant l'expression de *Noggin* au niveau des cellules épithéliales intestinales. *Noggin* est un antagoniste extracellulaire des Bmps donc, même si sa surexpression provient de l'épithélium, *Noggin* antagonise également les Bmps au niveau du mésenchyme intestinal. Les auteurs ont observé la formation de cryptes *de novo* au niveau des villosités. Ces cryptes possédaient un compartiment prolifératif et des cellules de Paneth logées au fond de celles-ci. Les souris développaient des polypes et des kystes, phénotypes retrouvés chez les patients atteints du syndrome de polypose juvénile.

Ces résultats suggèrent que les Bmps sont impliqués dans le contrôle de l'inhibition de la formation des cryptes ectopiques au niveau de l'intestin (Haramis *et al.*, 2004).



**Figure 8. Gradient des Bmps le long de l'axe crypte-villosité**

Les Bmps forment un gradient croissant le long de l'axe crypte-villosité. On peut également observer un gradient décroissant des antagonistes des Bmps (Noggin, Chordin, Gremlin) sécrétés par les myofibroblastes sous-épithéliaux permettant le maintien de la niche des cellules souches.

### 1.10.2 Délétion conditionnelle de *Bmpr1a* au niveau intestinal

Un autre groupe de recherche a effectué la délétion conditionnelle de *Bmpr1a* au niveau de l'intestin en utilisant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur de *Mx1* (*myxovirus resistance 1*). Ce promoteur permet l'expression de la Cre recombinase suite à l'injection d'acide polyinosinic polycytidylic (PolyI:C) ce qui crée une réponse inflammatoire à l'interféron qui elle induit l'expression de *Mx1*. Ce modèle permet la délétion de *Bmpr1a* au niveau de l'intestin, du foie et de la rate autant au niveau des cellules épithéliales, mésenchymateuses et sanguines de ces tissus. Chez ces souris, ils ont pu observer une augmentation du nombre de cryptes par villosité, une augmentation de la prolifération, une augmentation de nombre de fission cryptale et la présence de villosités



fusionnées. Ces souris développaient également des polypes et des kystes similaires au syndrome de polypose juvénile (He *et al.*, 2004). Cette deuxième étude démontrait pour une deuxième fois l'importance des Bmps dans la régulation de la formation des cryptes et au niveau du contrôle de la prolifération.

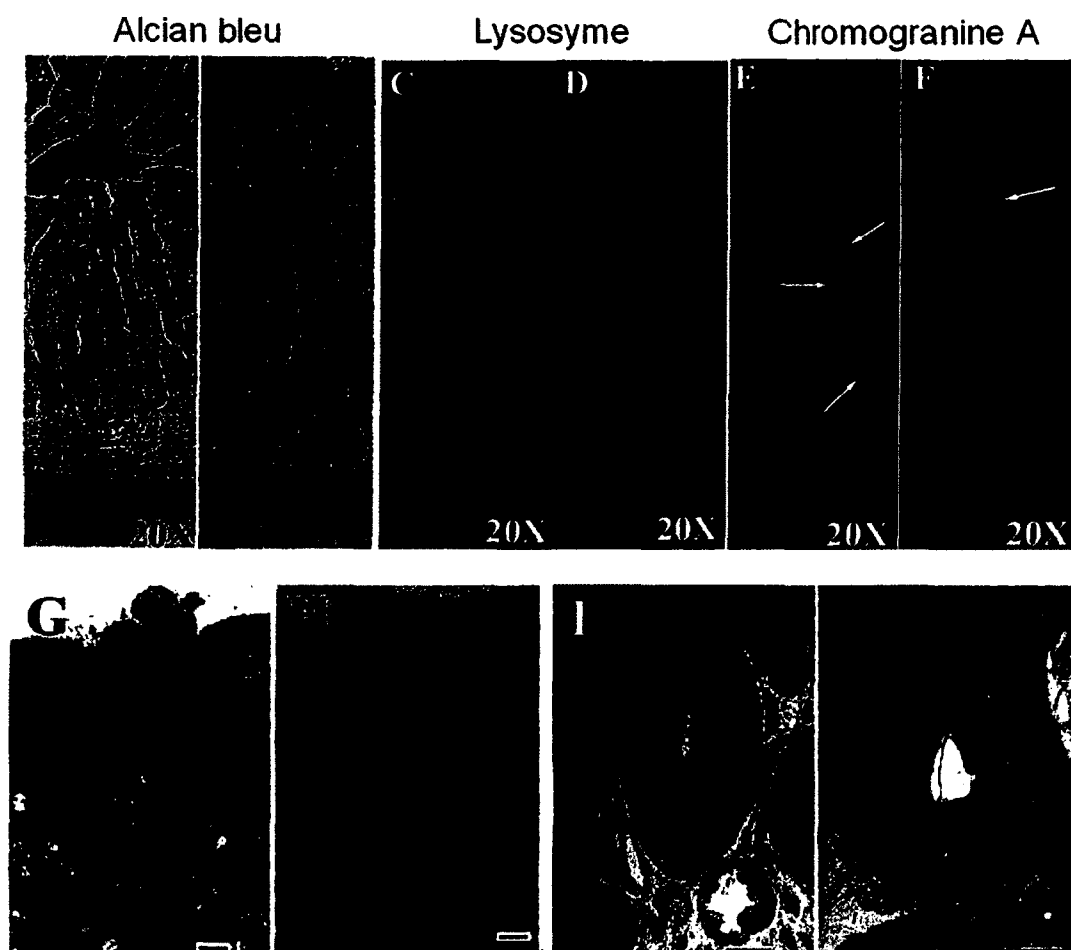
### 1.10.3 Délétion conditionnelle de *Bmpr1a* au niveau de l'épithélium intestinal

Une troisième étude a permis de compléter les deux études précédentes en effectuant la délétion conditionnelle de *Bmpr1a* strictement au niveau de l'épithélium intestinal. L'utilisation de la Cre recombinase sous le contrôle d'un promoteur tronqué de la *Villine* (Madison *et al.*, 2002) permet la délétion de *Bmpr1a* seulement au niveau des cellules épithéliales intestinales de l'intestin grêle et du colon. Chez ces souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup>, aucune formation de crypte *de novo* n'a été observée. Aucun développement de polypose n'a également pas été observé suggérant que ces deux phénomènes seraient associés à la perte de la signalisation des Bmps au niveau du mésenchyme ou au niveau de l'épithélium et du mésenchyme. Tout comme le groupe de Li (He *et al.*, 2004), une augmentation du nombre de fissions cryptales, du nombre de crypte par villosité et une augmentation de la prolifération cellulaire de l'épithélium ont été observés démontrant une fois de plus le rôle des Bmps dans le contrôle de la prolifération et du maintien de la niche des cellules souches. Une augmentation de la longueur des compartiments cryptaux et villositaires ont été observées. Les auteurs se sont par la suite intéressés aux rôles de la signalisation des Bmps dans la différenciation de l'épithélium intestinal. Aucune modulation des cellules entérocytaires n'a été observée. Par contre, les cellules de types sécréteurs sont quant à eux affectées par la perte des Bmps. Les auteurs ont observé une diminution du nombre de cellules entéroendocrine (Figure 9 E, F) ainsi que des défauts dans la différenciation terminale des cellules de Paneth et des cellules caliciformes. Les cellules de Paneth possédaient un marquage plus diffus du lysosyme (Figure 9 C, D) et une analyse de l'ultrastructure des cellules en microscopie électronique a permis de démontrer une diminution du nombre et des défauts de maturation des granules de sécrétion (Figure 9 I, J). Les cellules caliciformes semblaient plus compactes suite à une coloration à l'Alcian bleu

(Figure 9 A, B). Une analyse de l'ultrastructure des cellules a confirmé les défauts de différenciation terminale des cellules caliciformes (Figure 9 G, H). Le nombre et le positionnement des cellules de Paneth et caliciformes sont inchangés suggérant que la détermination de ces cellules est indépendante des Bmps, mais que leur différenciation est dépendante de la voie des Bmps. Quant aux cellules entéroendocrines, la diminution du nombre de cellules suggère que leur détermination est dépendante des Bmps. Une augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales intestinales a également été observée chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (Auclair *et al.*, 2007).

#### 1.10.4 Délétion conditionnelle de *Smad5* au sein de l'épithélium intestinal

Une étude subséquente de notre laboratoire a effectué la délétion conditionnelle de *Smad5* au niveau de l'épithélium intestinal à l'aide de la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur tronqué de la *Villine* (Madison *et al.*, 2002). Ces travaux ont démontré que *Smad5* était impliqué dans la régulation de la vitesse de migration et l'allongement des villosités observées chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup>. Les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> présentaient également une susceptibilité accrue au développement de maladie inflammatoire intestinale dues à des défauts au niveau des jonctions cellulaires de l'épithélium intestinal (Allaire *et al.*, 2011). L'impact de la perte de *Smad5* sur la différenciation cellulaire n'avait pas été analysé dans cette étude. Cependant, la prolifération et l'augmentation du compartiment cryptal n'étaient pas affectées chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> suggérant donc que ces fonctions cellulaires sont médiées par un autre BR-Smads seul ou en combinaison.



**Figure 9. Impact de la délétion de *Bmpr1a* sur les cellules de type sécréteur de l'épithélium intestinal**

Marquage et localisation des cellules caliciformes (Alcian bleu), de Paneth (Lysosyme) et entéroendocrines (Chromogranine A) des souris contrôles (A, C, E) et des souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (B, D, F). On peut observer que les cellules caliciformes semblent plus compactes et foncées chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (B) que chez les souris contrôles (A). Le marquage du lysosyme semble plus diffus chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (D) que celui des souris contrôles (C). Une diminution du nombre de cellules entéroendocrines a été observée chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (F) par rapport aux souris contrôles (E) suite à un marquage avec la chromogranine A. Ultrastructure des cellules caliciformes (G, H) et de cellules de Paneth (I, J) prise en microscopie électronique. Les cellules caliciformes sont plus compactes chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (H) que chez les souris contrôles (G). Le nombre de granules de sécrétion des cellules de Paneth est réduit chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (J) comparé aux cellules de Paneth des souris contrôles (I). Figure modifiée de Auclair *et al.*, 2007.

### 1.11 Projet de recherche, hypothèse et objectifs

Les différentes études sur la voie de signalisation des Bmps présentées précédemment démontrent l'importance de cette voie de signalisation dans le développement et le maintien de l'homéostasie de plusieurs organes et tissus dont la muqueuse intestinale. Par contre, très peu d'études ont analysé la contribution de chacun des BR-Smads dans ces processus. La délétion de *Smad5* au niveau de l'épithélium intestinal ne présente pas tous les phénotypes observés suite à la perte de la signalisation des Bmps au sein de l'épithélium. Nous avons donc émis l'hypothèse que les divers BR-Smads ont des rôles distincts au niveau des fonctions cellulaires telles que la migration, la prolifération, la détermination et la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé deux approches différentes : une approche *in vivo* et une approche *in vitro*.

Dans un premier temps, pour déterminer les rôles spécifiques de chaque BR-Smad au niveau de l'homéostasie de l'épithélium intestinal, le système de délétion conditionnelle Cre/loxP a été utilisé pour effectuer la délétion conditionnelle de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* strictement au niveau de l'épithélium intestinal chez la souris. Des lignées de souris possédant des sites loxP de part et d'autre d'un exon et une lignée de souris transgénique possédant la Cre recombinase sous le contrôle du promoteur tronqué de la *Villine* qui permet la recombinaison seulement au niveau des cellules épithéliales intestinales (Madison *et al.*, 2002). L'architecture de la muqueuse intestinale et les principaux types cellulaires ont été analysés par coloration histologique et immunofluorescence. L'ultrastructure des cellules a été analysée par microscopie électronique à transmission. La prolifération et la migration de l'épithélium intestinal ont été analysées suite à l'incorporation de BrdU 90 minutes ou 48 heures respectivement avant l'euthanasie des souris.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisé le système de shARN pour générer des lignées stables de cellules IEC-6 exprimant un shARN dirigé contre Smad1, Smad5 ou Smad8. L'utilisation de ce modèle cellulaire permet de confirmer les résultats obtenus *in vivo*, mais permet également d'approfondir l'analyse de la mécanistique cellulaire suite à la perte de Smad1, 5 ou 8. Des tests de blessure avec une lame de rasoir ont été effectués pour analyser la vitesse de migration des cellules IEC-6 shSmad. L'analyse de la prolifération cellulaire a été effectuée à l'aide d'une courbe de prolifération.

Une meilleure compréhension et caractérisation des rôles de chaque BR-Smad au niveau de l'épithélium intestinal permettra de mieux situer leur importance et leur implication dans le développement et la progression des maladies inflammatoires et de la carcinogenèse intestinale.

## II. Matériels et méthodes

### 2.1 Lignées de souris utilisées et croisement

Les différentes lignées de souris utilisées dans le cadre des travaux sont présentées dans le Tableau 2. Le Tableau 3 représente les différents croisements effectués pour obtenir les différentes lignées de souris contrôles et expérimentales.

**Tableau 2. Lignées de souris utilisées**

Lignées de souris	Race	Génotype	Source
<i>VillineCre</i>	C57BL/6	<i>VillineCre</i> /+	Dr. Gumucio (Madison <i>et al.</i> , 2002)
<i>Smad1</i>	C57BL/6	<i>Smad1</i> <sup>loxP/loxP</sup>	Dr. Roberts (Huang <i>et al.</i> , 2002)
<i>Smad5</i>	C57BL/6	<i>Smad5</i> <sup>loxP/loxP</sup>	Dr. Zwijsen (Umans <i>et al.</i> , 2003)
<i>Smad8</i>	F1 hybride C57BL/6, 129S	<i>Smad8</i> <sup>loxP/loxP</sup>	Dr. Martin (Huang <i>et al.</i> , 2009)
Type sauvage	C57BL/6	+/+	Jackson lab

Les souris utilisées en tant que contrôles possèdent un ou deux allèles loxP, mais ne possèdent pas d'allèle de la Cre recombinase (*VillineCre*). Quant à elles, les souris expérimentales possèdent à la fois la *VillineCre* et les deux allèles loxP pour un des BR-Smads. Aucune souris avec deux allèles *VillineCre* n'est générée afin d'écarter tous phénotypes associés à l'insertion aléatoire du transgène.

**Tableau 3. Croisements des lignées de souris utilisées**

<b>Croisement</b>	<b>Race</b>	<b>Génotype</b>	<b>Ratio mendélien</b>
<i>Smad</i> <sup>loxP/loxP</sup> x <i>Smad</i> <sup>loxP/loxP</sup>	C57BL/6	<i>Smad</i> <sup>loxP/loxP</sup>	100%
<i>VillineCre</i> x <i>Smad</i> <sup>loxP/loxP</sup>	C57BL/6	<i>VillineCre</i> ; <i>Smad</i> <sup>loxP/+</sup>	50%
<i>VillineCre</i> ; <i>Smad</i> <sup>loxP/+</sup> x <i>Smad</i> <sup>loxP/loxP</sup>	C57BL/6	<i>VillineCre</i> ; <i>Smad</i> <sup>loxP/loxP</sup>	25%
<i>VillineCre</i> x type sauvage	C57BL/6	<i>VillineCre</i> /+	50%
<i>Smad8</i> <sup>loxP/loxP</sup> (129S) x type sauvage (C57BL/6)	F1 hybride C57BL/6, 129S	<i>Smad8</i> <sup>loxP/+</sup>	50%

Toutes les souris sont maintenues en captivité à l'unité de souris transgéniques de l'Université de Sherbrooke sous diète normale et toutes les expériences effectuées avec ces souris ont été approuvées préalablement par le comité facultaire de protection des animaux de la Faculté de médecine et des sciences de la santé de l'université de Sherbrooke.

## 2.2 Identification et géotypage des souris

Entre 7 et 10 jours suivant la naissance des souriceaux, un de leurs orteils est coupé afin d'identifier individuellement chacun des souriceaux au sein de la portée, mais également afin d'en extraire l'ADN génomique. Les orteils sont digérés à 57°C avec la protéinase K (20 µl/ml) (Roche, Penzberg, Allemagne) pour une période de 14 à 18 heures. L'ADN génomique est par la suite extrait à l'aide du protocole «Spin Doctor Genomic DNA Prep» établi par la compagnie Gerard Biotech (Oxford, OH). L'ADN génomique nous permet d'établir le génotype des souris par réaction de polymérase en chaîne (PCR). Chaque réaction PCR contient : 2,1 µl de tampon d'amplification 10X (500 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris-Cl pH 8), 1 µl de chacune des amorces diluées à 100 mM (IDT, Coralville, IA), 1 unité d'enzyme d'amplification, 1 µl de dNTPs (Invitrogen), 0,5 à 1 µl d'ADN selon le génotype et le tout est complété à 21 µl avec de l'eau stérile. Les séquences des amorces utilisées ainsi que les conditions pour les réactions d'amplification de chaque génotype sont présentées dans le Tableau 4 (Appareil : Eppendorf Mastercycler EppgradientS). Suite à la réaction d'amplification, les produits PCR sont migrés sur un gel d'agarose 2% (Bio-Rad), 25 minutes à 110 Volts (Power-Pac 1000, Bio-Rad).

## 2.3 Euthanasie des souris

Les souris sont sacrifiées selon un protocole standard approuvé par un comité éthique. L'euthanasie des souris est effectuée par dislocation cervicale suite à une injection intramusculaire d'une dose de 1 µL de chlorhydrate de kétamine (Bioniche, Belleville, ON) par gramme de poids corporel de la souris. Pour les études de prolifération ou de migration cellulaire, une injection de 2-Bromo-déoxyuridine (BrdU) (Zymed Invitrogen, Markham, ON) de 10 µl par gramme de poids corporel est effectuée 1 heure 30 minutes ou 48 heures respectivement avant l'euthanasie. Les animaux sont par la suite disséqués afin de prélever les portions du tube digestif requises. Les prélèvements sont effectués sur une plaque de verre reposant sur de la glace et toutes les solutions utilisées sont maintenues sur glace. Une analyse de la longueur du tube digestif des souris est faite de façon systématique afin de



déterminer s'il peut y avoir des variations macroscopiques suite à la délétion du gène d'intérêt. Les tissus prélevés de ces souris sont traités selon leur utilisation ultérieure, soit pour l'extraction des protéines (totales ou nucléaires), soit des ARNs (épithéliaux et totaux) ou soit pour en faire des coupes histologiques.

**Tableau 4. Informations relatives au génotypage par PCR**

Génotype	Amorces utilisées	T° app. (°C)	Nb cycles	µl ADN	Produits (pbs)
<i>VillineCre</i>	5'- TgC CAC gAC CAA gTg ACA gCA ATg -3' 5'- ACC AgA gAC ggA AAT CCA TCg CTC-3'	55	40	1	377
<i>Smad1</i> <sup>loxP/loxP</sup>	5'- gAg CTC TgC TCC gCC ACT CA -3' 5'- gTT CCC ATT Tgg TTC CAA gC -3'	54,6	34	1	360 (allèle sauvage) 410 (allèle loxP)
<i>Smad5</i> <sup>loxP/loxP</sup>	5'- gAg CgT CTT CCT TAg CTA ATg Tg -3' 5'- TCg gAA CCA AAT AgT TCA CTg -3'	59	40	0,5	255 (allèle sauvage) ≈350 (allèle loxP)
<i>Smad8</i> <sup>loxP/loxP</sup>	5'- CAA AAg TgA ggg AAg CAg TCA -3' 5'- CCT TgA CAg CTg gAg AAA TTg -3'	59	40	0,75	259 (allèle sauvage) ≈490 (allèle loxP)

## 2.4 Fixation des tissus et inclusion dans la paraffine

Les tissus sont fixés dans une solution de paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 14 à 18 heures à 4°C. Ils sont par la suite lavés deux fois à l'aide d'éthanol 70% et conservés à 4°C dans l'éthanol jusqu'à leur circulation tels que décrite dans le Tableau 5. Les tissus sont par la suite inclus dans des blocs de paraffine. Des coupes histologiques de 5 µm d'épaisseur sont effectuées à partir de ces blocs sur des lames chargées (Fisherbrand) à l'aide d'un microtome (American Optical Co. Spencer-820).

**Tableau 5. Préparation des tissus en vue de l'inclusion dans la paraffine**

Étapes	Solution	Durée et répétitions
1	Éthanol 70%	1 heure, 1 fois
2	Éthanol 75%	1 heure, 1 fois
3	Éthanol 90%	1 heure, 1 fois
4	Éthanol 95%	1 heure, 1 fois
5	Éthanol 100%	1 heure, 1 fois 1h30, 2 fois
7	Xylène	1 heure, 3 fois
8	Paraffine 60°C	2h20, 2 fois

## 2.5 Immunofluorescence sur les coupes histologiques

Les tissus utilisés pour les immunofluorescences proviennent des coupes histologiques décrites dans la section précédente. Les lames doivent d'abord être déparaffinées puis réhydratées. Pour ce faire, les lames sont chauffées 15 minutes à 60°C puis trempées dans le xylène 100% (EMD chemicals) 2 fois 5 minutes. Ensuite, elles sont trempées successivement dans une solution d'éthanol 100% 2 fois 2 minutes, une solution d'éthanol 95% 2 fois 1 minute, une solution d'éthanol 80% 1 fois 1 minute et finalement une solution d'éthanol 70% 1 fois 1 minute. Finalement, les lames sont mises dans l'eau pour une minute avant d'être transférées dans 650 ml d'un tampon citrate de sodium 10 mM pH 6.0 (Fisher). Les lames dans le tampon citrate de sodium sont chauffées aux micro-ondes (Goldstar GMS-1124TW) à une intensité et une durée permettant au tampon de bouillir pendant 6 minutes. Cette opération permet de briser les ponts aldéhydes, créés lors de la fixation, rendant ainsi les épitopes plus accessibles aux anticorps. Les lames sont

ensuite refroidies dans la solution durant 10 minutes à température ambiante. Par la suite, les lames sont rincées à l'eau courante à faible débit durant 10 minutes, puis rincées 2 fois 5 minutes dans le PBS 1X avant de procéder au blocage des sites non spécifiques. Pour ce faire, les lames sont incubées avec une solution de PBT (BSA 2% (Sigma-Aldrich), triton X-100 0,1% (Fisher) dans du PBS 1X) recouvrant les tissus pour 45 minutes à température ambiante dans une chambre humide. Après cette incubation, on retire la solution de blocage et l'anticorps primaire dilué de façon appropriée dans le PBT (Tableau 6) est déposé sur les tissus (200 µl/ lame). L'anticorps primaire est incubé de 14 à 18 heures dans une chambre humide à 4°C à l'exception des anticorps pré-couplés à un fluorophore, qui sont incubés 45 minutes à 37°C.

**Tableau 6. Liste et dilution des anticorps primaires utilisées en immunofluorescence**

Anticorps	Dilution	Source	Fournisseur
BrdU-FITC	1/50	Souris	Roche
Lysosyme	1/500	Lapin	Dako
Chromogranine A	1/1000	Lapin	Immunostar

Les lames sont ensuite lavées avec du PBS 1X 2 fois 5 minutes et 200 µl d'une dilution (1/200) de l'anticorps secondaire couplé à un fluorophore est déposée sur chaque tissu pour une période de 2 heures à température ambiante dans une chambre humide et à l'abri de la lumière. Les lames sont par la suite lavées avec du PBS 1X 10 minutes avant d'être plongées dans une solution d'Evan bleu 90 secondes pour contre colorer les tissus suivi de deux lavages de 10 minutes avec du PBS 1X. Les lames sont trempées dans l'eau pour enlever les traces de sel, puis sont placées sous la hotte à l'abri de la lumière. Une fois que les lames ont séché, on dépose une goutte de milieu de montage Vectashield™ (Vector, Burlingame, CA) sur la lame, puis on recouvre le tout avec une lamelle à microscopie (VWR, West Chester, PA). Les immunofluorescences sont par la suite analysées par

microscopie à fluorescence à l'aide d'un filtre spécifique pour le fluorophore utilisé (Leica Mycrosystem. DM LB2).

## **2.6 Coloration à l'hématoxyline et l'éosine (H & E)**

La technique de coloration à l'hématoxyline et l'éosine permet de mettre en évidence les différentes structures morphologiques retrouvées à l'intérieur d'un tissu donné. L'hématoxyline colore les structures basophiles telles que les noyaux (acides nucléiques) tandis que l'éosine est responsable de la coloration des structures acidophiles. Une étape de déparaffinage et de réhydratation est d'abord effectuée sur les coupes histologiques telles que décrites dans la section 5. Les lames sont ensuite déposées dans une solution d'hématoxyline (Dako) pendant 3 minutes suivi d'un lavage avec de l'eau courante à faible débit pendant 5 minutes. Les lames sont par la suite déposées dans une solution de 1% acide alcool pour 30 secondes, lavées à l'eau courante 1 minute, puis trempées dans une solution d'eau ammoniacale 0,2% pendant 1 minute pour être finalement lavées à l'eau courante 5 minutes. Les tissus sont ensuite contre-colorés avec l'éosine (Fluka Sigma-Aldrich) pendant 1 minute 30 secondes. La déshydratation des coupes est ensuite effectuée par trempages de 2 fois 2 minutes dans l'éthanol 95%, 2 fois 2 minutes dans l'éthanol 100% et 2 fois 5 minutes dans le xylène. Les lames sont montées avec une goutte de Vectamount (Vector labs) et recouvertes avec des lamelles à microscopies (VWR).

## **2.7 Coloration à l'alcian bleu**

Une coloration à l'alcian bleu permet de marquer les cellules caliciformes produisant des mucines acides. Les lames sont d'abord déparaffinées puis réhydratées tel que décrit dans la section 5, mais les épitopes sont révélées avec une solution d'acide acétique 3%, plutôt qu'avec un tampon citrate de sodium 10 mM pH 6.0 (Fisher), durant 3 minutes. L'acide acétique est ensuite enlevé et remplacé par la solution d'alcian bleu 1%

dans 3% d'acide acétique pH 2,5 (Poly Scientific) pour 30 minutes. Par la suite, les lames sont lavées 10 minutes à l'eau courante dans un bécher. Une contre coloration est effectuée en utilisant le Nuclear Fast Red 0,1% (Poly Scientific) pour 45 secondes avant de laver de nouveau sous l'eau courante. Enfin, les lames sont déshydratées. Elles sont trempées 1 minute dans l'éthanol 70% suivi de 2 minutes dans éthanol 95%, 2 minutes dans l'éthanol 100% et finalement 5 minutes dans le Xylène (EMD chemicals). Les lames sont séchées sous la hotte. Ensuite, les lames sont montées avec une goutte de Vectamount (Vector labs), recouvertes d'une lamelle à microscopie (VWR, West Chester, PA).

## **2.8 Dissociation et recouvrement des cellules épithéliales intestinales**

Certaines expériences ont nécessité la dissociation de l'épithélium du mésenchyme de l'axe crypte villosité. Une technique développée par la Pre Perreault en 1998 (Perreault et Beaulieu, 1998) permet le recouvrement des cellules épithéliales à l'aide d'une solution non-enzymatique nommée MatriSpers<sup>TM</sup> (BD, Biosciences, Franklin Falls, NJ). L'extraction de diverses portions du tube digestif est d'abord effectuée et celui-ci doit être ouvert dans le sens longitudinal à l'aide de ciseaux chirurgicaux afin d'exposer la muqueuse intestinale à l'air ambiant. Les tissus sont ensuite découpés en petits morceaux d'environ 0,5 cm et déposés dans des tubes coniques de 15 ml contenant 4 ml de MatriSpers<sup>TM</sup>. Ces tubes sont incubés 14 à 18 heures à 4°C et ensuite agités de façon à dissocier les cellules épithéliales du reste du tissu. On ajoute à la solution de MatriSpers<sup>TM</sup> 4 ml d'une solution de PBS 1X froide afin de faciliter le recouvrement du surnageant. Le surnageant contenant les cellules épithéliales est récolté à l'aide d'une pipette volumétrique et centrifugé pendant 3 minutes à 300 g dans une nouvelle série de tubes coniques de 15 ml (centrifugation effectuée à 4°C). Suite à la centrifugation, le surnageant est jeté et les cellules épithéliales formant le culot vont servir à extraire les ARN ou les protéines.

## 2.9 Isolement de fractions enrichies en cellules épithéliales intestinales

Chaque section du tube digestif est ouverte dans le sens longitudinal à l'aide de ciseaux chirurgicaux. Une lamelle est par la suite frottée sur la muqueuse intestinale afin d'obtenir des échantillons concentrés et enrichis en muqueuse épithéliale. Il faut ensuite procéder à l'extraction des protéines ou des ARNs selon le protocole approprié (Langlois *et al.*, 2009).

## 2.10 Extraction d'ARN

Les tissus sont congelés rapidement dans l'azote liquide, puis brisés en petits morceaux à l'aide d'une lame de rasoir. Ces morceaux sont déposés dans un tube de 2 ml contenant 1 ml de solution de dénaturation (Ambion). Les tissus sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un polytron permettant de broyer l'échantillon d'intestin recueilli. Les extraits d'ARNs sont effectués à l'aide d'un protocole établi par la compagnie Ambion nommé Totally RNA™. Ce protocole peut servir autant pour les extractions d'ARNs provenant de tissus ou de cellules et les temps et les volumes peuvent varier selon la quantité de tissus ou de cellules utilisées. 1 ml de phénol : chloroforme IAA (Ambion) est ajouté au mélange avant d'agiter le tout vigoureusement pendant une minute. La préparation est déposée sur glace pendant 5 minutes pour être ensuite centrifugée à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C. La phase aqueuse (phase supérieure) est recueillie suite à cette centrifugation et est déposée dans un nouveau tube de 2 ml préalablement identifié. On ajoute dans ces nouveaux tubes 100 µl d'acétate de sodium 3M pH 4,5 (Ambion) avant d'agiter le tout par inversion. 1 ml de phénol : chloroforme acide pH 4,5 (Ambion) est ajouté à la solution contenant la phase aqueuse et l'acétate de sodium. Ce mélange est agité vigoureusement pendant 1 minute et la préparation est ensuite laissée sur glace pendant 5 minutes. Une centrifugation à 10 000 g pendant 5 minutes à 4°C suivra cette étape. La phase aqueuse (phase supérieure) est encore une fois conservée dans une nouvelle série de tubes de 1,5 ml à laquelle on ajoute un volume égal d'isopropanol (Fisher) avant de les agiter par inversion et de les incub

pendant au moins 30 minutes à -20°C. Après ce temps d'incubation, la préparation est centrifugée à 10 000 g à 4°C pendant 15 minutes. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 50 µL d'eau DEPC 0,1% (Ambion). Les hydrates de carbone présents dans les extraits d'ARN peuvent être éliminés par précipitation au chlorure de lithium (LiCl) (Ambion). Il faut ajouter 25 µL de solution de 7,5M LiCl/50mM EDTA à l'extrait d'ARN, agiter doucement et incubé au moins 30 minutes à -20°C. Le mélange est finalement centrifugé à 12 000 g, 15 minutes à 4°C et le surnageant est éliminé pour resuspendre le culot avec 300 µL d'éthanol 70%. puis en agitant doucement pendant 3 minutes afin d'enlever les sels résiduels. Le tout est centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes à 4°C et le surnageant est jeté. Finalement, le culot d'ARN est resuspendu avec 50 µL d'eau DEPC 0,1%. Les extraits d'ARNs sont conservés à -80°C.

## 2.11 DNase et RT-PCR

Une étape de traitement à la DNase est généralement effectuée pour les extraits qui seront utilisés dans un contexte de RT-PCR afin d'enlever toute trace d'ADN génomique présent dans les échantillons d'ARN. Le tampon de DNase 5X (Roche) et une unité de DNase I (Roche) sont ajoutés à chaque échantillon d'ARN. Les échantillons sont ensuite incubés 30 minutes à 37°C et la DNase est finalement inactivée en ajoutant de l'EDTA (concentration finale 5mM, Fisher) au mélange suivi d'une incubation à 75°C pendant 5 minutes. Les échantillons sont dosés et migrés pour s'assurer de leur intégrité. Par la suite, 1 µg d'ARN est transféré dans un nouveau tube 1,5 ml et le volume est complété à 10 µl avec de l'eau DEPC 0,1%. Une incubation à 75°C pendant 5 minutes permet de dénaturer les ARN suivi d'une incubation de 5 minutes sur glace pour empêcher leur repliement. Ensuite, la réaction de transcription inverse pour transformer les ARNm en ADNc est effectuée en ajoutant 4 µl de tampon AMV reverse transcriptase 5X (Roche), 0,8 µl de dNTPs 10 mM (Invitrogen), 2 µl de poly dTs (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), 1 µl d'inhibiteur de RNase (Roche), 1,5 µl d'enzyme AMV reverse transcriptase (Roche) et 0,7 µl d'eau DEPC 0,1%. La solution est incubée à 42°C pendant une heure.

Une incubation de 5 minutes à 95°C permet d'inactiver l'enzyme et la réaction. Les ADNc sont conservés à -80°C.

## **2.12 Analyse du niveau d'expression des ARNm**

### **2.12.1 Analyse en PCR quantitative**

La PCR quantitative est un outil permettant d'établir des comparaisons quantitatives entre les niveaux d'expressions du messager d'un gène d'intérêt à l'intérieur de différentes populations de souris contrôles et expérimentales. La méthode est basée sur la détection de la variation d'intensité de fluorescence générée par l'incorporation d'un composé chimique (SYBR green<sup>TM</sup>) à l'intérieur de l'ADN double brin produit au cours d'une réaction d'amplification par PCR. L'intensité de fluorescence émise par le SYBR green<sup>TM</sup> dépend directement de la quantité d'ADN double brin retrouvée dans le tube réactionnel. Les essais en PCR quantitatif sont réalisés à partir de banques d'ADNc des différentes populations de souris en utilisant la trousse Quantitect SYBR green PCR Kit<sup>TM</sup>, selon les recommandations du fabricant (Qiagen, Mississauga, ON) et avec l'utilisation de l'appareil Light Cycler II® (Roche). Des dilutions sériées d'un ADNc (habituellement une souris contrôle) sont effectuées afin de déterminer l'efficacité d'amplification de la réaction de PCR et permettent de créer une courbe de calibration pour chaque paire d'amorces. L'efficacité d'amplification idéale de la réaction est de 2 et représente la synthèse d'une copie complète du segment d'ADN d'intérêt par un brin matrice disponible à chaque cycle d'amplification. La courbe de calibration permet de minimiser les variations inter-expériences en réutilisant une des dilutions dans chaque réaction de PCR quantitatif. Afin de quantifier efficacement l'expression d'un gène d'intérêt, l'expression d'un gène de référence est quantifiée en utilisant les mêmes échantillons d'ADNc. Les gènes de références utilisés doivent répondre aux deux critères suivant : 1) présenter des niveaux d'expression similaires à ceux du gène d'intérêt et 2) leurs niveaux d'expression ne doivent pas être influencés par la délétion effectuée. Finalement, les valeurs obtenues pour le gène



de référence et le gène d'intérêt sont normalisées et représentées sous forme d'histogramme. Les séquences des amorces utilisées pour la PCR quantitative ont été définies à l'aide du logiciel web Primer3 et sont représentées dans le Tableau 7.

### **2.12.2 Analyse en PCR semi-quantitative**

Les analyses en PCR semi-quantitative permettent de visualiser les différences de niveau d'expression d'un gène, mais est une technique moins quantitative que le PCR quantitatif (section 12.1). Une réaction PCR standard est effectuée avec des échantillons d'ADNc provenant de souris contrôles et expérimentales. Cependant, le nombre de cycles de la réaction se situe entre 24 et 30 cycles ce qui permet d'atteindre le milieu de la phase exponentielle d'amplification. Passé ce nombre de cycles, les modulations seront plus difficiles à observer suite à la migration des amplicons sur gel d'agarose car l'intensité des bandes est saturée et n'est alors plus représentative du niveau d'expression. Les amorces utilisées en PCR semi-quantitative sont présentées dans le Tableau 7.

## **2.13 Extraction de protéines**

### **2.13.1 Protéines tissulaires**

Les tissus sont d'abord homogénéisés à l'aide d'un polytron dans 1 ml de tampon de lyse Ripa (50 mM Tris-HCl pH 7.4 (Fisher), 150 mM NaCl (Fisher), 1% NP-40 (Fluka, Sigma-Aldrich), 0,5% p/v sodium déoxycholate (Sigma-Aldrich), 0,5% Triton X-100 (Fisher), 1 mM EDTA (Fisher) et 0,2% SDS (Fisher)) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases : PIC (Sigma-Aldrich) (10 µl/ml), sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich) (10µl/5ml) et fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF, 10 µl/ml)(Sigma-Aldrich)). Une sonication à faible intensité pendant 10 secondes est par la suite effectuée sur glace pour lyser les cellules et briser l'ADN. Les échantillons sont

incubés 10 minutes sur glace et sont ensuite centrifugés à 13 500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et les protéines sont conservées à -80°C.

(Auclair *et al.*, 2007).

**Tableau 7. Amorces utilisées en PCR quantitative ou semi-quantitative**

Gènes d'intérêt	Séquences utilisées	T°app.	Produits
<i>Smad1</i>	5'- gAg TTC CCA TTT ggT TCC AAg - 3' 5' - gAg CCA gAA ggC TgT gCT gAg - 3'	59	136
<i>Smad5</i>	5'- gAT TTg CAg AgC CAT CAC gA - 3' 5' - TTg Tgg CTC Agg TTC CTg AA -3'	59	199
<i>Smad8</i>	5' - CCT CAA ggT CTT CAA CAA CCA - 3' 5' - TTC ACA AAg CTC ATC CgA ATC - 3'	59	117
<i>Lgr5</i>	5'- gCg AgT CTg CTg TCC ATT AAC - 3' 5' - ATg ggA CAA ATg CAA CTg AAg -3'	59	177
<i>Bmi1</i>	5'- TTT ATg CAg CTC ACC CgT C - 3' 5' - TTT CCg ATC CAA TCT gCT CTg -3'	59	148
<i>Pbgd</i>	5' - CCT CCT ggC TTT ACT ATT ggA - 3' 5' - TAg CTg AgC CAC TCT CCT CAg - 3'	59	149

### 2.13.2 Protéines de cellules en culture

Pour les extractions protéiques de cellules en culture, le milieu de culture est d'abord retiré et les cellules sont lavées 2 fois en ajoutant du PBS 1X à 4°C. Le PBS 1X est aspiré et on ajoute un volume variant entre 250 µL et 1 ml de tampon de lyse Ripa contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (voir section 13.1). Le volume de tampon de lyse varie en fonction de la taille du pétri utilisé pour cultiver les

cellules, mais également du type cellulaire. Les cellules sont par la suite décollées à l'aide d'un grattoir et le tampon contenant les cellules est déposé dans un tube de 1,5 ml. Les échantillons sont ensuite soniqués sur glace à faible intensité pendant 10 secondes. Les lysats sont incubés pendant 10 minutes sur glace et centrifugés à 13 500 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est finalement récupéré et les extraits protéiques sont conservés à -80°C.

### **2.13.3 Extraction de protéines nucléaires de cellules épithéliales de jéjunum de souris**

Pour effectuer une extraction de protéines nucléaires de cellules épithéliales de jéjunum de souris, un isolement de fraction enrichie en épithélium est d'abord effectué (section 9). Les cellules sont transférées dans un tube de 1,5 ml auquel 1 ml de PBS 1X à 4°C est ajouté pour laver les cellules. Les cellules sont récupérées avec une étape de centrifugation à 1500 rpm pendant 5 minutes à 4°C et le surnageant est retiré. Pour 50 mg de cellules, 500 µl de tampon de lyse (10 mM HEPES pH 7.9, 1 mM EDTA, 60 mM KCl, 0.5 % NP-40, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) sont ajoutés. Après une incubation de 5 minutes sur glace, les échantillons sont centrifugés 20 secondes à 13 000 rpm pour culotter les noyaux. Le surnageant contenant les protéines cytosoliques est recueilli et conservé à -80°C. Le culot est resuspendu dans 500 µl de tampon Nuclear Resuspension Buffer (NRB) (250 mM Tris-Cl pH 7.8, 60 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Les échantillons sont alors soumis à trois séries de changements de température brusques (2 minutes dans l'azote liquide, 2 minutes dans un bain à 37°C, vortex 5 secondes) puis centrifugés à 13 000 rpm pendant 10 minutes à 4°C. Finalement, le surnageant est recueilli et les protéines nucléaires sont conservées à -80°C.

### **2.14 Immunobuvardage**

Les extraits protéiques sont d'abord quantifiés par mesure d'absorbance à 562 nm selon la méthode BCA de Pierce (Pierce, Rockford, IL). Pour chaque échantillon, 20 ou 30

µg de protéines sont transférés dans un tube 1,5 ml auquel est ajouté 6,25 µl de tampon de migration (NuPAGE LDS sample buffer 4X) et 2,5 µl d'une solution réductrice (NuPAGE sample reducing agent (DTT) 10X), puis le volume est complété à 25 µl avec de l'eau stérile. Les échantillons sont déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide 4 – 12% (NuPAGE, Invitrogen, Carlsbad, CA) et migrés par électrophorèse en condition dénaturantes à 200 volts pendant 1 heure 15 minutes à température ambiante dans un tampon MOPS/SDS (Invitrogen). Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Roche) en utilisant un tampon de transfert (Invitrogen) contenant 10% méthanol sous un courant de 30 Volts pendant 1 heure à température ambiante. La membrane contenant les protéines est ensuite incubée pendant 2 heures à température ambiante avec une solution de TBS 1X, 0,1% Tween 20 (Fisher), 5% protéine de lait (Carnation, Nestle, North York, ON) pour bloquer les sites non spécifiques. Cette solution servira également à diluer l'anticorps primaire et secondaire. L'anticorps primaire est incubé avec la membrane de 14 à 18 heures avec agitation à 4°C selon la dilution appropriée (Tableau 8). Après cette incubation, la membrane est lavée 5 fois 10 minutes sous agitation à l'aide d'une solution de TBS 1X, 0,1% Tween 20 avant d'être mise en contact avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase de raifort (HRP) dilué 1 / 3000 pour une incubation de 1 heure à la température de la pièce. La membrane est de nouveau lavée 5 fois 10 minutes à l'aide de la solution de TBS 1X, 0,1% Tween 20 et l'activité enzymatique de la peroxydase de raifort est détectée à l'aide d'une solution de ECL plus (Western Blotting Detection System™) (Amersham Bioscience) qui est déposée sur la membrane pendant 5 minutes. La membrane est finalement enveloppée dans une pellicule de plastique puis exposée sous un film photographique Hyperfilm™ (Amersham Biosciences) pour une durée variable selon l'expérience (Auclair *et al.*, 2007; Perreault *et al.*, 2001).

**Tableau 8. Liste des anticorps primaires utilisés en immunobuvardage**

Anticorps	Dilution	Source	Fournisseur
actine	1/10 000	Chèvre	Santa cruz
p-Smad5	1/500	Lapin	Abcam
p-Smad1/5/8	1/500	Lapin	Cell signaling
Smad5	1/1000	Lapin	Abcam
$\alpha$ -tubuline	1/5000	Souris	Sigma
Cyclin D1	1/500	Lapin	Santa cruz
p27	1/500	Lapin	Santa cruz
Lamine B	1/500	Chèvre	Santa cruz

### 2.15 Génération des séquences de shARN

Les séquences de shARN contre Smad1, Smad5 ou Smad8 ont d'abord été générées à l'aide de l'outil bio-informatique «shRNA Explorer™» de la compagnie Gene Link™ retrouvé sur le site : <http://www.genelink.com/sirna/shrnai.asp>. Ces séquences ont été générées à partir de la séquence des ARNm codant pour Smad1, 5 et 8 chez le rat (*Rattus norvegicus*) et obtenue sur le site NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ces séquences ont été introduites dans une matrice de nucléotides facilitant le clonage des shARN dans le vecteur pLentiV6-U6 (Invitrogen). Cette technique de clonage a été développée dans le laboratoire du Dr. François Boudreau (Université de Sherbrooke). La composition des séquences obtenues est schématisée ci-dessous. On retrouve les séquences pour chacun des brins des shARN générés contre Smad1, Smad5 ou Smad8 ainsi que les séquences des shARN mutés. Ces shARN mutés sont utilisés comme shARN contrôle (3 nucléotides différents dans la séquence ne permettant plus la reconnaissance des Smad1 et 5). Le sh1348 muté (Smad8) est en cours de génération. Les séquences des shARNs possèdent, surligné en jaune : des sites de type correspondant aux sites de clonage *Bam*HI et *Xho*I, en

noir : une séquence de type Loop permettant de former la boucle du shARN, en orange : le site de terminaison de l'ARN polymérase III et en rouge et bleu : les séquences sens et antisens des shARN générés. Les séquences sous-lignées représentent les 3 nucléotides changés lors de la génération des shARN mutés. En dessous de ces séquences, il est possible de voir la structure formée lorsque l'appariement des deux oligonucléotides est effectué.

### Séquences des shARN utilisées

#### shSmad1

##### sh963

sens

5'-- TGGTGCTCTATTGTGTACTAT --3'

antisens

5'-- ATAGTACACAATAGAGCACCA --3'

Top 5'- GATCCCTGGTGCTCTATTGTGTACTATTCAAGAGAATAGTACACAATAGAGCACCA TTTTT GGAAC-3'  
(68pb)

Bot 5'-TCGAGTTCCAAAAAATGGTGCTCTATTGTGTACTATTCTCTTGAAATAGTACACAATAGAGCACCAAGG-3'

5'- GATCCCTGGTGCTCTATTGTGTACTATTCAAGAGAATAGTACACAATAGAGCACCA TTTTT GGAAC-3'  
3'-GGACCAAGAGATAACACATGATAAAGTTCTCTTATCATGTGTTATCTCGTGGTAAAAAACCTTGAGCT-5'

##### sh963 muté

sens

5'-- TGGTGCTCTTTAGTGTACTAT --3'

antisens

5'-- ATAGTACACTTAAAGAGCACCA --3'

Top 5'- GATCCCTGGTGCTCTTTAGTGTACTATTCAAGAGAATAGTACACTTAAAGAGCACCA TTTTT GGAAC-3'  
(68pb)

Bot 5'-TCGAGTTCCAAAAAATGGTGCTCTTTAGTGTACTATTCTCTTGAAATAGTACACTTAAAGAGCACCAAGG-3'

5'- GATCCCTGGTGCTCTTTAGTGTACTATTCAAGAGAATAGTACACTTAAAGAGCACCA TTTTT GGAAC-3'  
3'-GGACCAAGAGATAAATCACATGATAAAGTTCTCTTATCATGTGATTTTCTCGTGGTAAAAAACCTTGAGCT-5'

**shSmad5****sh832**

sens

5'--CCAGCATATCTAGCAGAGATG--3'

antisens

5'--CATCTCTGCTAGATATGCTGG--3'

Top 5'-GATCCCCCAGCATATCTAGCAGAGATGTTCAAGAGACATCTCTGCTAGATATGCTGGTTTTGGAAAC-3'  
(68pb)

Bot 5'-TCGAGTTCCAAAAAACAGCATATCTAGCAGAGATGTCTCTTGAACATCTCTGCTAGATATGCTGGGG-3'

5'-GATCCCCCAGCATATCTAGCAGAGATGTTCAAGAGACATCTCTGCTAGATATGCTGGTTTTGGAAAC-3'  
3'-GGGGTCGTATAGATCGTCTCTACAAGTTCTCTGTAGAGACGATCTATACGACCAAAAAACCTTGAGCT-5'

**sh832 muté**

sens

5'--CCAGCATATGATGCAGAGATG--3'

antisens

5'--CATCTCTGCATCATATGCTGG--3'

Top 5'-GATCCC CCAGCATATGATGCAGAGATGTTCAAGAGA CATCTCTGCATCATATGCTGGTTTTGGAAAC-3'  
(68pb)

Bot 5'-TCGAGTTCCAAAAAACAGCATATGATGCAGAGATGTCTCTTGAA CATCTCTGCATCATATGCTGGGG-3'

5'-GATCCCCCAGCATATGATGCAGAGATGTTCAAGAGA CATCTCTGCATCATATGCTGGTTTTGGAAAC-3'  
3'-GGGGTCGTATACTACGTCTCTACAAGTTCTCT GTAGAGACGTAGTATACGACC AAAAAACCTTGAGCT-5'

**sh1533**

sens

5'--CCAGCACAGATACTGTGAGCTG--3'

antisens

5'--CAGCTCACAGTATCTGTGCTGG--3'

Top 5'-GATCCCCCAGCACAGATACTGTGAGCTGTTCAAGAGACAGCTCACAGTATCTGTGCTGGTTTTGGAAC-3'  
(70pb)

Bot 5'-TCGAGTTCCAAAAAACAGCACAGATACTGTGAGCTGTCTCTTGAACAGCTCACAGTATCTGTGCTGGGG-3'

5'-GATCCCCCAGCACAGATACTGTGAGCTGTTCAAGAGACAGCTCACAGTATCTGTGCTGGTTTTGGAAC-3'  
3'-GGGGTCGTGTCTATGACACTCGACAAGTTCTCTGTCGAGTGTTCATAGACACGACCAAAAAACCTTGAGCT-5'

### sh1533 muté

sens

5'--CCAGCACAGTATCTGTGAGCTG--3'

antisens

5'--CAGCTCACAGATACTGTGCTGG--3'

Top 5'-GATCCCCCAGCACAGTATCTGTGAGCTGTTCAAGAGACAGCTCACAGATACTGTGCTGGTTTTGGAAC-3'  
(70pb)

Bot 5'-TCGAGTTCCAAAAAACAGCACAGTATCTGTGAGCTGTCTCTTGAACAGCTCACAGATACTGTGCTGGGG-3'

5'-GATCCCCCAGCACAGTATCTGTGAGCTGTTCAAGAGACAGCTCACAGATACTGTGCTGGTTTTGGAAC-3'  
3'-GGGGTCGTGTCTATAGACACTCGACAAGTTCTCTGTCGAGTGTCTATGACACGACCAAAAAACCTTGAGCT-5'

### shSmad8

#### sh1348

sens

5'--GGCTTCTACCACTGCAACTCG--3'

antisens

5'--CGAGTTGCAGTGGTAGAAGCC--3'

Top 5'-GATCCCGGCTTCTACCACTGCAACTCGTTCAAGAGACGAGTTGCAGTGGTAGAAGCCTTTTGGAAC-3'  
(68pb)

Bot 5'-TCGAGTTCCAAAAAGGCTTCTACCACTGCAACTCGTCTCTTGAACGAGTTGCAGTGGTAGAAGCCGG-3'

5'-GATCCCGGCTTCTACCACTGCAACTCGTTCAAGAGACGAGTTGCAGTGGTAGAAGCCTTTTGGAAC-3'  
3'-GGCCGAAGATGGTGACGTTGAGCAAGTTCTCTGCTCAACGTCACCATCTTCGGAAAAACCTTGAGCT-5'



## 2.16 Appariement des oligonucléotides et clonage dans le vecteur pLentiV6-U6

Des oligonucléotides simples brins purifiés par procédé de type HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ont été générés à partir de ces séquences grâce à la compagnie IDT (Coralville, IA). Ces oligonucléotides ont été resuspendus avec de l'eau stérile à une concentration de 100  $\mu$ M. Des oligonucléotides doubles brins ont été générés en utilisant un protocole d'appariement et en mélangeant les séquences sens avec les séquences antisens complémentaires pour que chaque oligonucléotide simple brin soit présent à une concentration de 20  $\mu$ g/10 $\mu$ L dans un tampon d'appariement (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA). Les mélanges réactionnels sont incubés à 65°C pendant 10 minutes et le bloc contenant les tubes est déposé sur le comptoir pour permettre à la température des mélanges de descendre graduellement jusqu'à la température ambiante. Cette étape permet de générer les oligonucléotides doubles brins qui pourront être clonés dans le vecteur pLentiV6-U6. Ce vecteur permet de cloner un gène d'intérêt sous le contrôle du promoteur viral U6. Les shARNs contre Smad1, Smad5 ou Smad8 ont été clonés dans des vecteurs pLentiV6-U6 possédant une résistance à la puromycine, la blasticidine ou la néomycine respectivement afin de permettre la combinaison de deux ou trois shSmads lors de l'infection des cellules IEC-6 (section 19). Le vecteur est digéré à l'aide des enzymes de restriction *Bam*HI et *Xho*I de façon à générer des bouts cohésifs permettant d'effectuer la ligation des oligonucléotides doubles brins dans ce vecteur. Les étapes entourant ce clonage seront omises puisqu'ils englobent des techniques de biologie moléculaire générale. L'ADN des vecteurs est conservé à -20°C.

## 2.17 Cultures cellulaires

Les cellules 293T et les cellules IEC-6 utilisées dans le laboratoire ont été maintenues en culture dans un incubateur sous une atmosphère contrôlée contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Les cellules 293T sont des cellules épithéliales de reins fœtaux humains transformées et ont été achetées à l'ATCC (American Type Culture Collection) sous la désignation

293T/17 [HEK 293T/17] (CRL-11268). Les cellules IEC-6 (CRL-1592) sont des cellules épithéliales de cryptes d'iléons de rats nouveau-nés immortalisées provenant également de l'ATCC. Les cellules 293T ont servi aux transfections permettant de valider les séquences de shRNA utilisées et à produire les Lentivirus pour infecter les cellules IEC-6. Elles ont été maintenues en culture dans un milieu réduit en sérum de type Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM (Wisent Inc., ST-BRUNO, QC), 10% FBS (v/v, Fetal bovine serum, Wisent Inc.), 2 mM glutamine (Invitrogen), 10 mM HEPES (Invitrogen), 100 Unités/ml pénicilline-streptomycine (Invitrogen)). Les cellules IEC-6 ont été utilisées dans les différentes expériences d'infections, d'immunofluorescences, de test de blessure et de test de prolifération ainsi que pour les extraits protéiques. Elles ont été maintenues en culture dans un milieu réduit en sérum de type DMEM, 5% FBS, insuline 0,1 unité/ml, 2 mM glutamine, 10 mM HEPES, 100 Unités/ml pénicilline-streptomycine.

## **2.18 Production de Lentivirus et infection des cellules IEC-6**

La production de Lentivirus s'effectue par transfection d'ADN plasmidique codant pour les protéines structurales des virus dans les cellules 293T (ViraPower™ Promoterless Lentiviral Gateway® Expression System, Invitrogen). 7,5 µg d'ADN plasmidique des constructions pLentivirusV6-U6 contenant les constructions des shARN est cotransfecté avec 7,5 µg de chacun des vecteurs d'expression commerciaux pLP1, pLP2 et pLP/VSV-G (Invitrogen) dans les 293T à l'aide de l'agent de transfection Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) dans un milieu non supplémenté en sérum Opti-MEM® (Invitrogen). Le milieu de culture Opti-MEM® est remplacé par du milieu de culture normal après 4 heures d'incubation. Les cellules ayant été en contact avec l'agent de transfection sont incubées pendant 48 heures dans un incubateur à 37°C, sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Les virus produits se récoltent par aspiration du milieu de culture et sont séparés des contaminants cellulaires à l'aide d'une seringue et d'un filtre de 0,45 µm (PALL life science, Ann Arbor, MI). Les virus sont aliquotés et conservés à -80°C. L'infection des cellules IEC-6 s'effectue dans des plaques de 6 puits et les cellules doivent être entre 50 et 75 % de confluence le jour de l'infection. Les virus sont d'abord décongelés rapidement à

37°C dans un bain d'eau chaude. On ajoute du polybrène (4 µg/µL, Sigma-Aldrich) frais aux virus de façon à ce que la concentration finale du polybrène soit de 4 µg/ml. Le milieu de culture des cellules IEC-6 est retiré et la suspension virale contenant le polybrène est ajoutée dans les puits. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Pendant ce temps, du polybrène (4 µg/µL) est ajouté au milieu de culture à raison de 4 µg/ml. Ce milieu de culture est ajouté après l'heure d'incubation et les cellules sont incubées 48 heures à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Après ces deux jours d'incubation, il est possible d'effectuer une sélection à l'aide de l'antibiotique blasticidine (10µg/ml, Sigma-Aldrich), puromycine (2 µg/ml, Sigma-Aldrich) ou G418 (100 µg/ml, Sigma-Aldrich) pendant 7 à 10 jours pour sélectionner les cellules ayant incorporé les virus dans la population totale. Après sélection, il est possible de travailler avec une population stable de cellules possédant un shARN.

## **2.19 Tests de blessure sur une monocouche de cellules**

Les populations stables de cellules générées suite à l'infection à l'aide des Lentivirus contenant les shARN ont été soumises à un test de motilité cellulaire. Ce test s'effectue sur une monocouche confluyente de cellules auquel on aura retiré le milieu de culture. Une lame de rasoir est utilisée afin de blesser la monocouche en effectuant un mouvement latéral et en appliquant une pression raisonnable afin de ne pas trop endommager le plastique du pétri. Les cellules blessées sont lavées deux fois à l'aide d'une solution de PBS 1X stérile et sont cultivées en présence de milieu de culture DMEM, 5% FBS, 2 mM glutamine, 0,01 M HEPES, 100 Unités/ml pénicilline-streptomycine auquel on ajoute de l'hydroxyurée (2 mM, Sigma-Aldrich) pendant 48 heures à 37°C sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. L'hydroxyurée est un inhibiteur de prolifération qui inhibe la synthèse de l'ADN. Les cellules sont fixées et colorées (section 20) et les cellules ayant migré au-delà du trait de la blessure sont ensuite comptées.

## **2.20 Fixation et coloration des cellules au Bleu Evans**

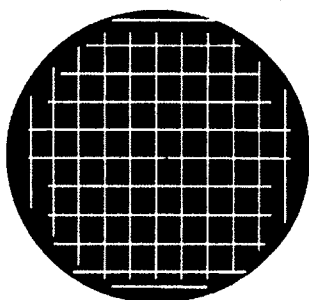
Les cellules ayant subi des tests de blessures sont fixées et colorées après 48 heures de migration puis les cellules ayant franchi le trait de blessures sont décomptées manuellement à l'aide d'un microscope à contraste de phase. La fixation se fait par une première étape de rinçage des cellules à l'aide de PBS 1X froid. Par la suite, une solution de méthanol, (EMD Chemicals) à titre d'agent de fixation, est ajoutée sur les cellules pendant 10 minutes à -20°C. Le méthanol est ensuite retiré et les cellules sont colorées au Bleu Evans pendant 3 minutes. Les cellules sont finalement rincées à l'eau des photos des marges de migration sont prises avec un microscope à contraste de phase.

## **2.21 Cinétique de multi-blessures**

Afin d'analyser la variation des niveaux protéiques et les niveaux de phosphorylation de protéines d'intérêt lors d'un processus de migration, une cinétique de multi-blessures (Figure 10) a été effectuée sur une monocouche de cellules IEC-6 à l'aide d'un embout de caoutchouc. Les cellules blessées sont lavées 2 fois avec du PBS 1X stérile et les cellules sont incubées à 37°C avec du milieu DMEM 5% FBS contenant 2 mM d'hydroxyurée et des extraits protéiques sont effectuées après 1-2-4-8-12-16-20-24-36 et 48 heures.

## **2.22 Courbe de prolifération cellulaire**

Des essais de prolifération ont été effectués afin d'évaluer l'impact de la délétion de chaque BR-Smad sur la prolifération cellulaire. Les cellules IEC-6 possédant un shARN contre Smad1, 5 ou 8 et leurs contrôles ont étéensemencées à 50 000 cellules par puits dans des plaques 6 puits et incubées à 37°C. Des décomptes du nombre de cellules viables ont été effectués à l'aide d'un compteur de cellules automatique (Countess® Automated cell counter, Invitrogen) après 1, 3, 5 et 7 jours de culture.



**Figure 10. Multi-blessures en forme de quadrillé sur une monocouche de cellules**

Les multi-blessures permettent d'optimiser le nombre de cellules en migration ce qui facilite l'analyse des modulations induites lors d'un processus migratoire. Des traits parallèles et perpendiculaires sont effectués avec un embout de caoutchouc formant ainsi un quadrillé sur une monocouche de cellules IEC-6.

### **2.23 Valeurs morphométriques**

Les valeurs morphométriques pour la longueur des compartiments cryptaux et villositaires ainsi que pour le ratio de la distance de migration sur la longueur totale de l'axe crypte-villosité ont été obtenues à l'aide du logiciel Metamorph (Universal Imaging). La calibration s'effectue à l'aide d'une lame micrométrique (Graticules, Tonbridge, Kent, UK).

### **2.24. Densitométrie**

La densitométrie a été effectuée à l'aide du logiciel Image J sur les immunobuvardages en effectuant le ratio de la densité des bandes de la protéine d'intérêt sur la densité de l' $\alpha$ -tubuline (extraits totaux) ou de la Lamine B (extraits nucléaires) utilisées comme contrôles de chargement des protéines.

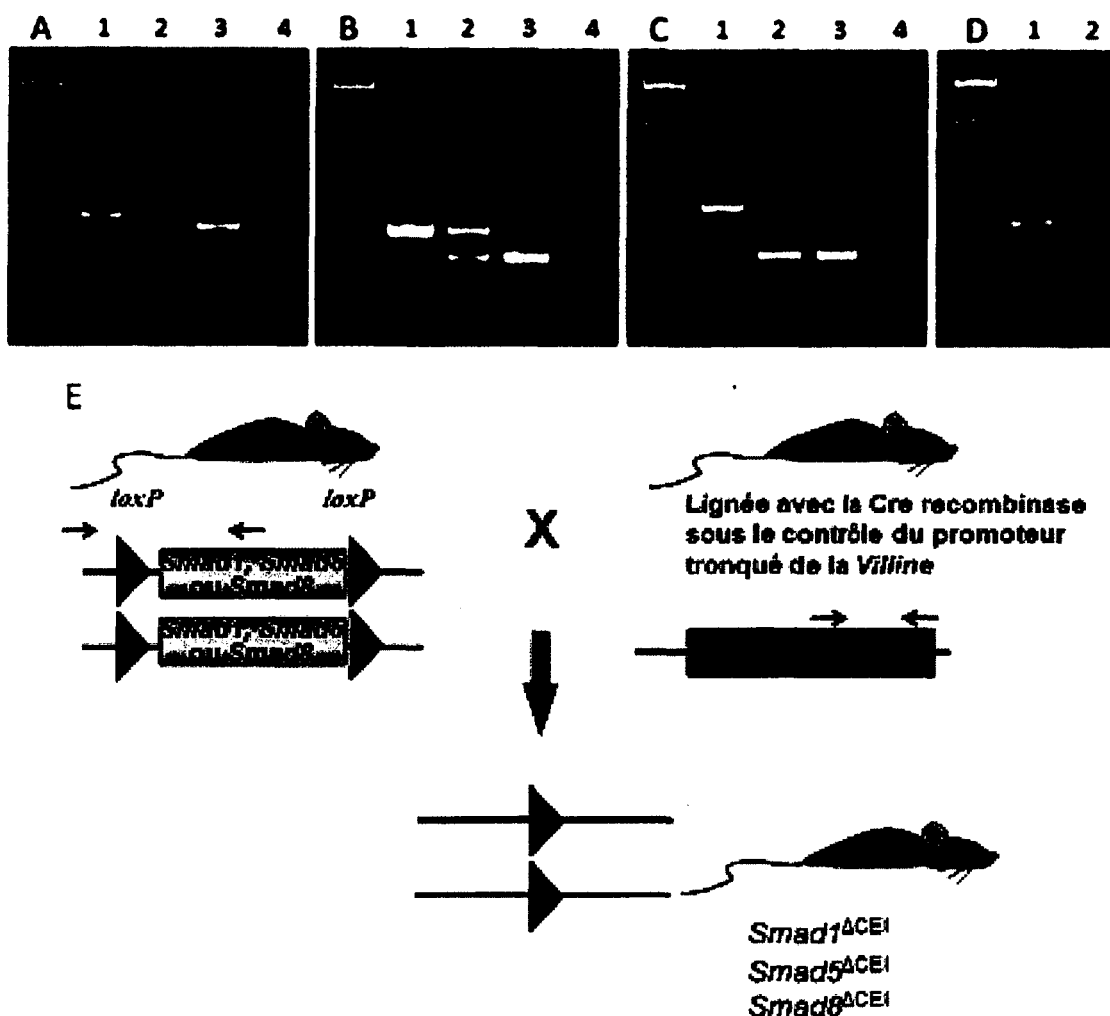
## 2.25 Décomptes cellulaires et analyses statistiques

Les décomptes cellulaires sont effectués sans connaître le génotype des souris âgées de 90 jours. 20 à 30 axes cryptes-villosités sont comptés par souris et ce sur un minimum de 4 souris pour chaque génotype. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA). La comparaison entre deux groupes a été effectuée soit par un test de t (Student) pour séries non appariées (distribution normale), soit par un test de Mann-Whitney (distribution non normale). L'analyse statistique des valeurs obtenues pour les valeurs morphométriques ont été analysées par ANOVA à deux voies. Pour le niveau d'expression des ARN messagers, les valeurs obtenues sont normalisées par rapport à l'expression d'un gène de référence (*Pbgd*) puis normalisées à 1 par rapport aux souris contrôles. Étant donné que les valeurs ne décrivent pas une distribution normale, un test de Mann-Whitney a été effectué pour l'ensemble des qPCRs. Les barres d'erreurs représentent l'erreur type de la moyenne.

### III. Résultats

#### 3.1 Génération et détermination du génotype des souris

La détermination du génotype des souris est effectuée par PCR, avec l'ADN génomique issu d'un orteil de souris, à l'aide d'amorces situées de part et d'autre d'une séquence loxP pour chacun des BR-Smads (Figure 11). L'insertion de la séquence loxP augmente la longueur du brin amplifié de 50 à 150 pbs dépendamment de la construction utilisée lors de la génération de l'allèle loxP par recombinaison homologue. La *VillineCre* est un transgène inséré aléatoirement dans le génome de la souris et est détecté grâce à des amorces reconnaissant la séquence de la Cre recombinase (Figure 11 D). Les souris *Smad*<sup>loxP/loxP</sup> sont croisées avec les souris *VillineCre; Smad*<sup>loxP/+</sup> ce qui permet de générer les souris *VillineCre; Smad*<sup>loxP/loxP</sup> que je nommerai *Smad*<sup>ΔCEI</sup> pour alléger le texte (Figure 11 E). Les souris *Smad*<sup>ΔCEI</sup> sont viables et retrouvées selon un rapport mendélien. Les souris *Smad8*<sup>loxP/loxP</sup> ont été obtenues récemment au sein du laboratoire. Les résultats présentés pour ces souris seront donc plus préliminaires que ceux des deux autres BR-Smads.



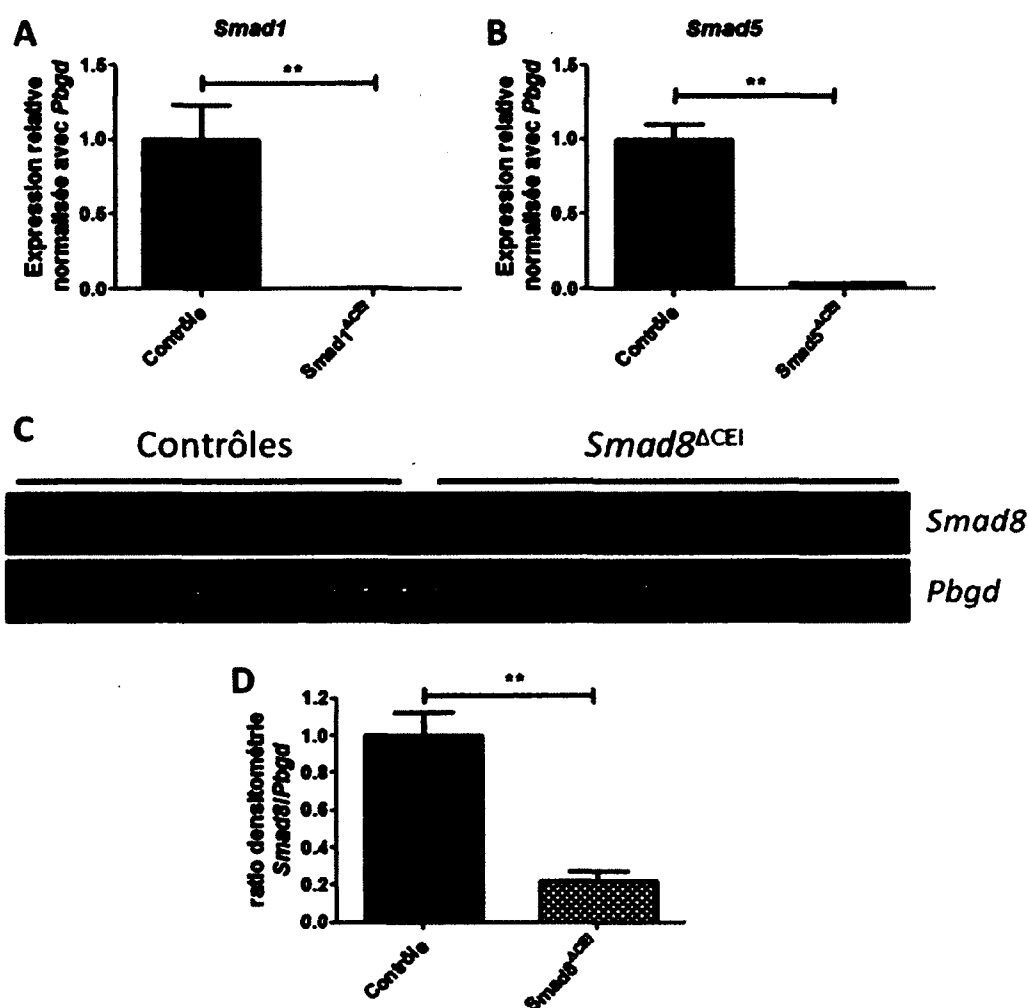
**Figure 11. Détermination du génotype des lignées de souris utilisées**

Migration sur gel d'agarose des amplicons PCR pour le génotypage des lignées de souris *Smad1* (A), *Smad5* (B), *Smad8* (C) et *VillineCre* (D). Pour *Smad1*, *Smad5* et *Smad8* (A, B, C), le puits 1 correspond au génotype possédant deux allèles loxP, le puits 2 est un hétérozygote (loxP/+), le puits 3 est une souris de type sauvage alors que le puits 4 est un contrôle négatif. Pour le génotype de la *VillineCre* (D), le puits 1 correspond à la présence du transgène alors que le puits 2 est une souris ne possédant pas le transgène. Représentation des séquences loxP de part et d'autre d'un exon de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* et du croisement effectué pour obtenir les souris possédant la délétion d'un BR-Smad au niveau des cellules épithéliales intestinales ( $\Delta$ CEI) (E). La localisation des amorces utilisées pour la détermination du génotype est représentée par des flèches.



### 3.2 Validation de la perte des *Smads 1, 5* ou *8* au sein de l'épithélium intestinal

Étant donné que chaque BR-Smad est présent au niveau de l'épithélium, du mésenchyme et des muscles de l'intestin à l'exception de Smad8 qui n'est pas retrouvé au niveau du mésenchyme intestinal (Arnold *et al.*, 2006). Une séparation de l'épithélium du mésenchyme sous-jacent a été effectuée en utilisant la solution non enzymatique MatriSpere (BD Biosciences). Le niveau d'expression de chacun des BR-Smads a par la suite été analysé par PCR quantitatif ou semi-quantitatif. Les allèles de délétions conditionnelles utilisées ne suppriment qu'une partie de chacun des gènes des BR-Smads. L'ARNm des BR-Smads est donc exprimé normalement chez les souris *Smad<sup>ACE1</sup>*, mais aucune protéine fonctionnelle ne sera traduite à partir de ces ARNm. Pour valider la délétion de chaque BR-Smad, des amorces spécifiquement dirigées contre l'exon excisé par la Cre recombinase pour chacun des BR-Smads ont été utilisées. Par PCR quantitatif, on peut observer une diminution significative du niveau d'expression des *Smad1* et de *Smad5* de plus de 95% au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 12 A, B). La perte de *Smad8* a été analysée par PCR semi-quantitatif où on peut noter une diminution de l'expression de *Smad8* d'environ 80% (Figure 12 C) qui a été confirmée par analyse en densitométrie (Figure 12 D).



**Figure 12.** Validation de la perte de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* au niveau de l'épithélium intestinal

PCR quantitatif sur des extraits de cellules épithéliales de jéjunum démontrant la diminution de l'expression de *Smad1* (↓99%) (A), et de *Smad5* (↓96%) (B) au niveau de l'épithélium intestinal. (C) PCR semi-quantitatif sur des extraits d'épithélium de jéjunum démontrant la perte de *Smad8*. *Pbgd* est utilisé comme contrôle de chargement. L'analyse en densitométrie des bandes obtenues en PCR semi-quantitatif démontre une diminution de 80% de l'expression de *Smad8* au niveau de l'épithélium intestinal (D). Mann-Whitney \*\*  $p < 0.0043$  (A)  $n=6$ , (B)  $n=5$  et (D)  $n=6$ .

### **3.3 Impact de la délétion de chaque BR-Smad sur l'architecture de l'axe crypte-villosité**

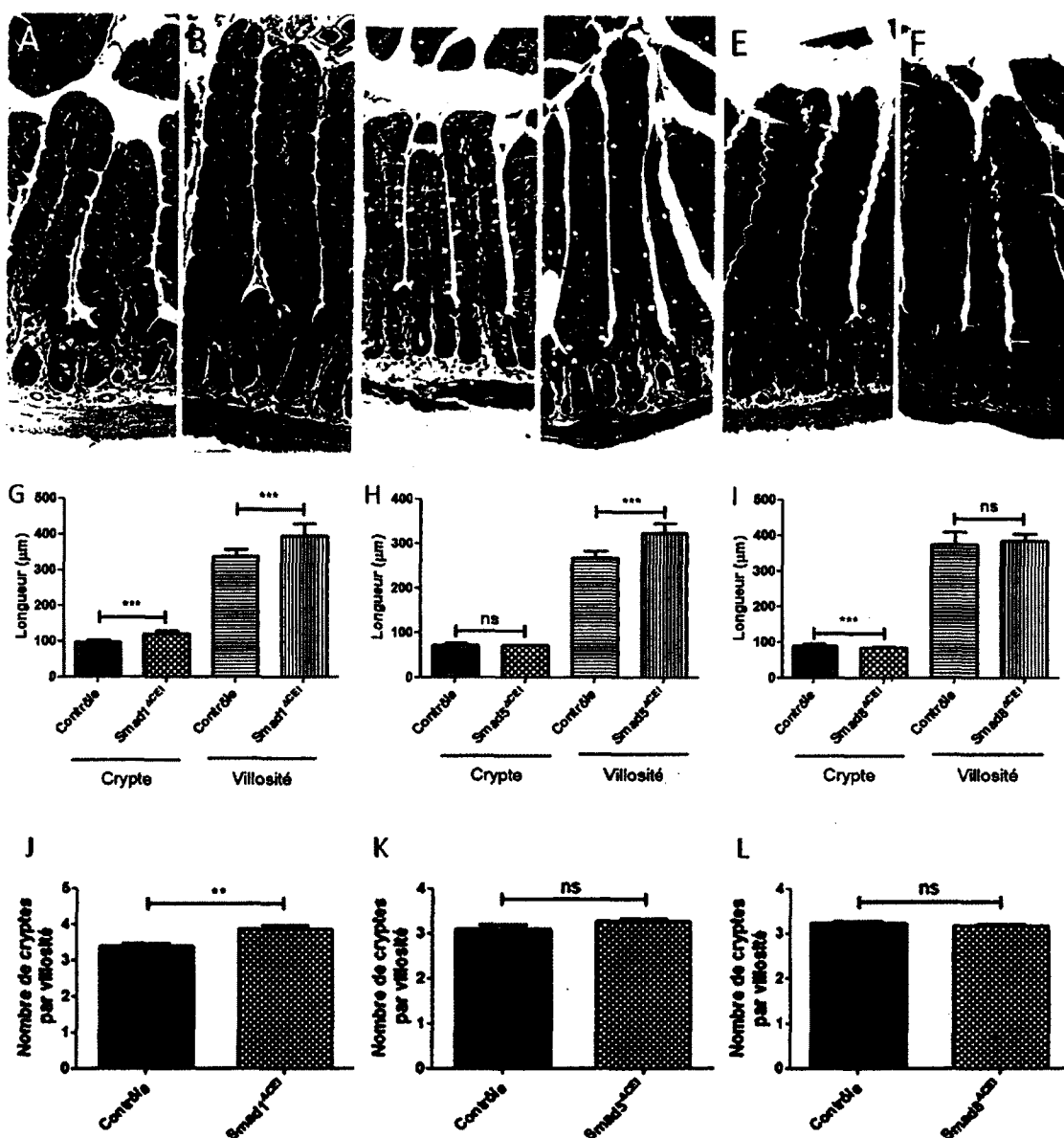
Aucune modulation macroscopique n'a été observée par rapport aux souris contrôles pour chaque génotype. Afin d'analyser l'impact de la délétion de chacun des BR-Smads sur l'architecture générale de l'axe crypte-villosité, des colorations à l'hématoxyline et à l'éosine sur des coupes histologiques de jéjunum de souris contrôles et expérimentales pour chaque génotype ont été effectuées. L'architecture générale de la muqueuse intestinale n'est pas affectée par la perte de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* au niveau épithélial.

#### **3.3.1 Longueur des compartiments de l'axe crypte-villosité**

Par contre, suite à la délétion de *Smad1*, on observe une augmentation de la longueur du compartiment cryptal et des villosités (Figure 13 A, B). La délétion de *Smad5* n'entraîne pas de changement de la longueur des cryptes, mais une augmentation de la longueur des villosités avait été observée (Figure 13 E, F) (Allaire *et al.*, 2011). La délétion de *Smad8*, quant à elle, entraîne une légère diminution de la longueur du compartiment cryptal, mais aucun changement de la longueur des villosités (Figure 13 I, J). Des mesures morphométriques ont été effectuées à l'aide du logiciel Métamorph (Universal Imaging) pour confirmer les modulations dans la longueur des compartiments (Figure 13 C, G, K).

#### **3.3.2 Nombre de cryptes par villosité**

Une augmentation du nombre de cryptes par villosité a été observée suite à la délétion de *Smad1* alors que la délétion de *Smad5* ou de *Smad8* n'entraînent pas de modulation du nombre de cryptes par villosité (Figure 13 D, H, L).



**Figure 13. Impact de la délétion de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* sur l'architecture de l'axe crypte-villosité**

Des colorations hématoxyline et éosine (H&E) sur des coupes histologiques de jéjunum de souris ont démontré un allongement des compartiments cryptaux et villositaires suite à la délétion de *Smad1* (A, B). La délétion de *Smad5* n'entraîne pas de variation de la longueur du compartiment cryptal, mais entraîne une augmentation de la longueur des villosités (C, D) (Allaire *et al.*, 2011). La perte de *Smad8*, quant à elle, entraîne un raccourcissement mineur des cryptes, mais aucun changement au niveau des villosités (E, F). Les valeurs morphométriques, obtenues à l'aide du logiciel Metamorph (Universal Imaging), ont permis de confirmer statistiquement les modulations observées par H&E (G, H, I). Une

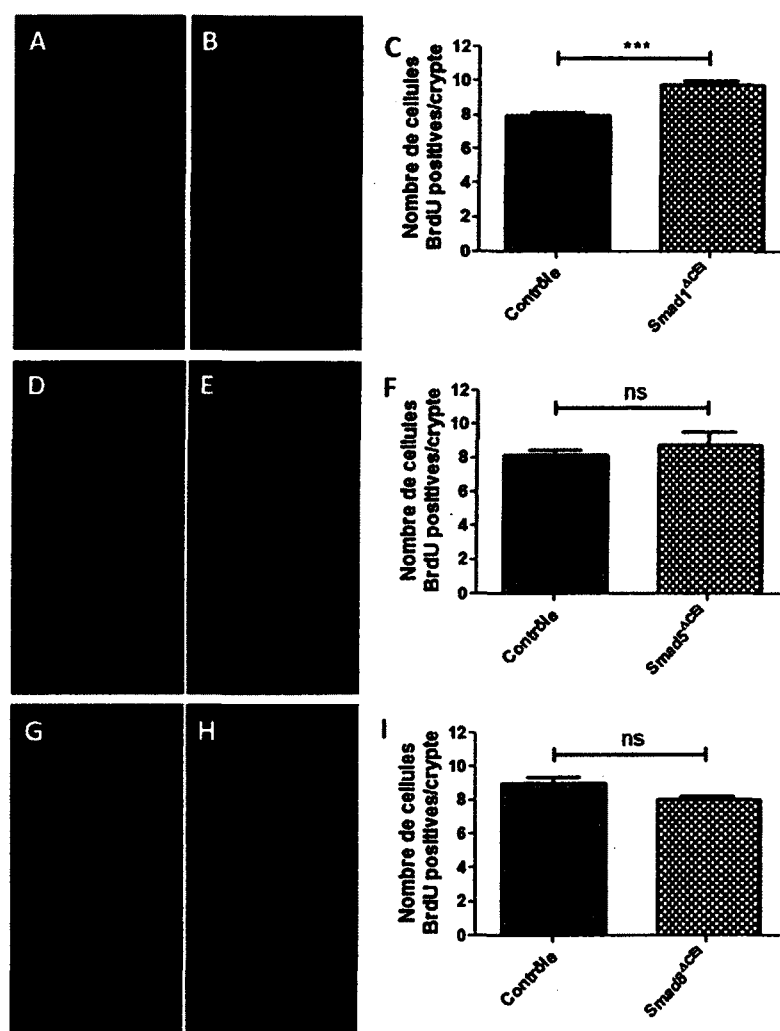
augmentation du nombre de cryptes par villosité a été également observée chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> (A, B) et confirmée par décompte du nombre de cryptes par villosité (J). La délétion de *Smad5* ou *Smad8* n'entraîne aucun changement dans le nombre de cryptes par villosité (K, L). ANOVA à 2 voies (G – I): \*\*\*  $p < 0,0001$  (G)  $n=4$ , (H)  $n=3$ , (I)  $n=5$ . Test de t (J – L): (J) \*\*  $p < 0,0068$   $n=5$ .

### 3.4 Impact de la délétion des BR-Smads sur la prolifération de l'épithélium

Pour déterminer lequel ou lesquels des BR-Smads est impliqué dans la prolifération cellulaire de l'épithélium intestinal, une injection de BrdU (analogue de la thymidine) a été effectuée 90 minutes avant l'euthanasie des souris. L'incorporation du BrdU dans l'ADN des cellules prolifératives peut par la suite être visualisée par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre le BrdU. Les résultats obtenus démontrent une augmentation du nombre de cellules prolifératives chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> (Figure 14 A, B) alors qu'aucune modulation n'a été observée chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> (Figure 14 D, E) (Allaire *et al.*, 2011) et chez les souris *Smad8*<sup>ΔCEI</sup> (Figure 14 G, H). Des décomptes du nombre de cellules BrdU positives ont été effectués et ont permis de confirmer une augmentation significative du nombre de cellules prolifératives chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> (Figure 14 C) tandis qu'il n'y a pas de différence significative chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> et *Smad8*<sup>ΔCEI</sup> par rapport à leurs contrôles respectifs (Figure 14 F, I).

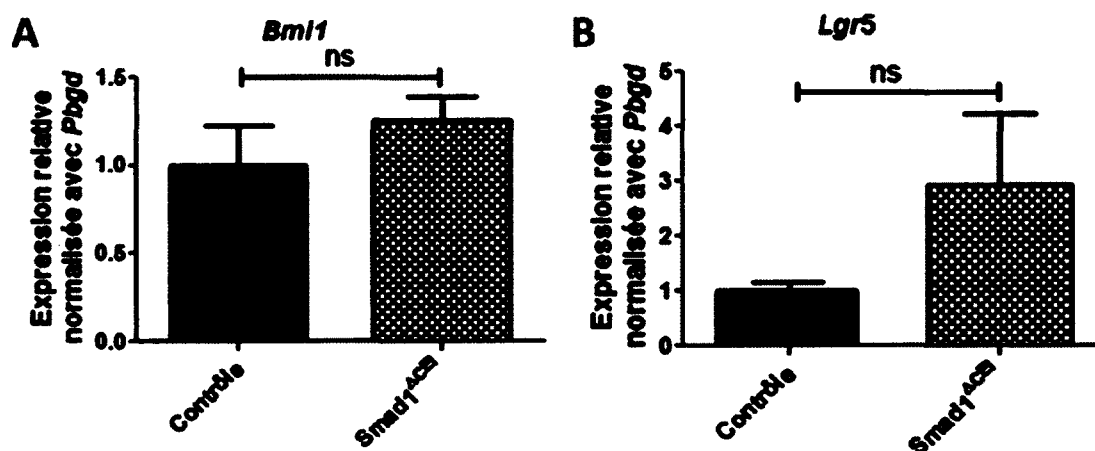
#### 3.4.1 État des cellules souches chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>

Étant donné qu'une augmentation de la prolifération cellulaire ainsi que du nombre de cryptes par villosité avaient été observés chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> et que ces processus sont dépendants des cellules souches, nous avons vérifié par PCR quantitatif l'expression de marqueurs spécifiques pour chacun des deux types de cellules souches de l'épithélium intestinal. Aucune modulation significative des niveaux d'expression de *Bmi1* (+ 4) ou de *Lgr5* (CBC) n'a été observée (Figure 15 A et B). On peut cependant noter une tendance à l'augmentation de l'expression de *Lgr5* chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> (Figure 15 B).



**Figure 14. Impact de la délétion de *Smad1* sur la prolifération de l'épithélium intestinal**

Immunofluorescences avec un anticorps dirigé contre le BrdU permettant de visualiser les cellules en phase S. Une augmentation du nombre de cellules BrdU positives est observée chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> (B) par rapport aux souris contrôles (A). Cette augmentation a été confirmée par décompte cellulaire (C). La délétion de *Smad5* (E) (Allaire *et al.*, 2011) ou de *Smad8* (H) n'entraîne pas de modulation significative du nombre de cellules prolifératives par rapport à leurs contrôles respectifs (D, G). Décompte cellulaire du nombre de cellules BrdU positives par crypte (C, F, I). Test de t (C) \*\*\*  $p < 0,0003$   $n=5$ , (F)  $n=4$ , (I)  $n=3$ .



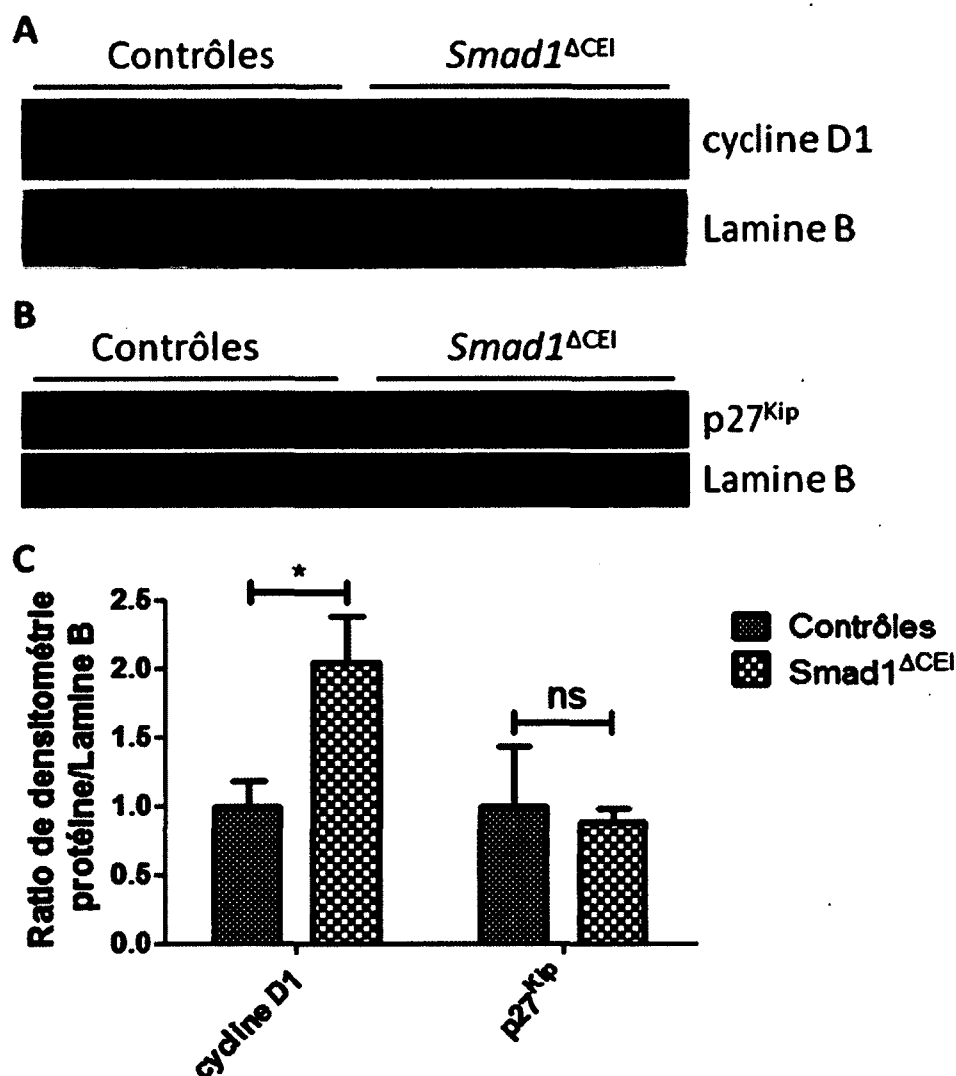
**Figure 15.** Expression des marqueurs de cellules souches épithéliales intestinales chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>

Quantification de l'expression de (A) *Bmi1* (+4) et (B) *Lgr5* (CBC) qui sont des marqueurs pour chacun des types de cellules souches sur des extraits d'épithélium de jéjunum des souris contrôles et *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> par PCR quantitatif. Aucune modulation significative n'est observée quant au niveau d'expression de ces deux gènes. On peut cependant observer une tendance à l'augmentation de l'expression de *Lgr5* chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>. Mann-Whitney n=5.

### 3.4.2 Régulation du cycle cellulaire chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>

Nous nous sommes par la suite intéressés aux différentes protéines impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>. Nous avons d'abord étudié les niveaux protéiques de la cycline D1 et de la protéine inhibitrice du cycle cellulaire p27<sup>Kip</sup>. La cycline D1 est impliqué dans la régulation du transit entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire et cette protéine était augmentée chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (Auclair *et al.*, 2007). La protéine p27<sup>Kip</sup> est impliquée dans la régulation négative du complexe Cdk4,6/cycline D1 et Cdk2/cycline E. Des analyses par immunobuvardages ont démontré une augmentation des niveaux protéiques de la cycline D1 chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> par rapport aux souris contrôles (Figure 16 A) alors qu'aucune modulation de p27<sup>Kip</sup> n'a été observée (Figure 16 B). L'analyse par

densitométrie a permis de démontrer une augmentation significative de deux fois du niveau protéique de la cycline D1 (Figure 16 C).



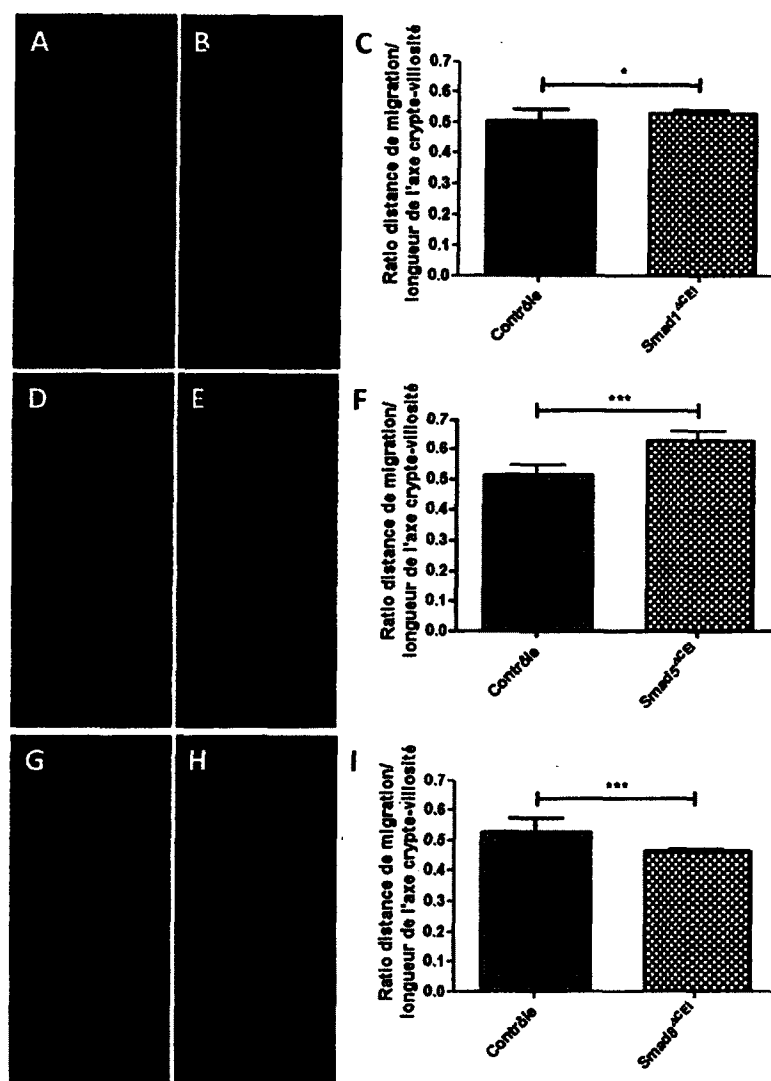
**Figure 16.** Augmentation du niveau protéique de la cycline D1 suite à la délétion de *Smad1*

Immunobuvardages sur des extraits d'épithélium de jéjunum de souris (A, B). Une augmentation significative de la cycline D1 est observée chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> par rapport aux contrôles (A). Les niveaux de p27<sup>Kip</sup> ne présentent aucune modulation (B). La Lamine B a été utilisée comme contrôle de chargement sur gel pour les extraits nucléaires. Des analyses en densitométrie ont permis de confirmer l'augmentation de la cycline D1 de deux fois par rapport aux contrôles (C). Le ratio protéine par rapport à la Lamine B a été normalisé à 1 en conditions contrôles. Mann-Whitney \*  $p < 0,0317$   $n=5$ .



### 3.5 Impact de la délétion des BR-Smads sur la migration de l'épithélium intestinal

Afin de déterminer lequel ou lesquels des BR-Smads sont responsable de l'augmentation de la vitesse de migration observée chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup>, une incorporation de BrdU 48 heures avant l'euthanasie des souris a été effectuée. Les cellules, en phase S lors de l'injection, ayant incorporées le BrdU vont par la suite migrer le long de la villosité. Cette migration peut être visualisée par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre le BrdU sur des coupes histologiques de jéjunum. Chez les souris contrôles, les cellules marquées migrent jusqu'au premier tiers ou maximum la moitié de la villosité (Figure 17 A, D, G). Une augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales avait été démontrée suite à la délétion de *Smad5* au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 17 D, E) (Allaire *et al.*, 2011). Contrairement aux souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup>, il ne semble pas avoir de modulation de la vitesse de migration des cellules épithéliales chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> et *Smad8*<sup>ΔCEI</sup> (Figure 17 B, E, H). Les variations de la vitesse de migration ont été confirmées par l'analyse du ratio du front de migration sur la longueur de l'axe crypte-villosité à l'aide du logiciel Metamorph (Universal Imaging) (Figure 17 C, F, I).



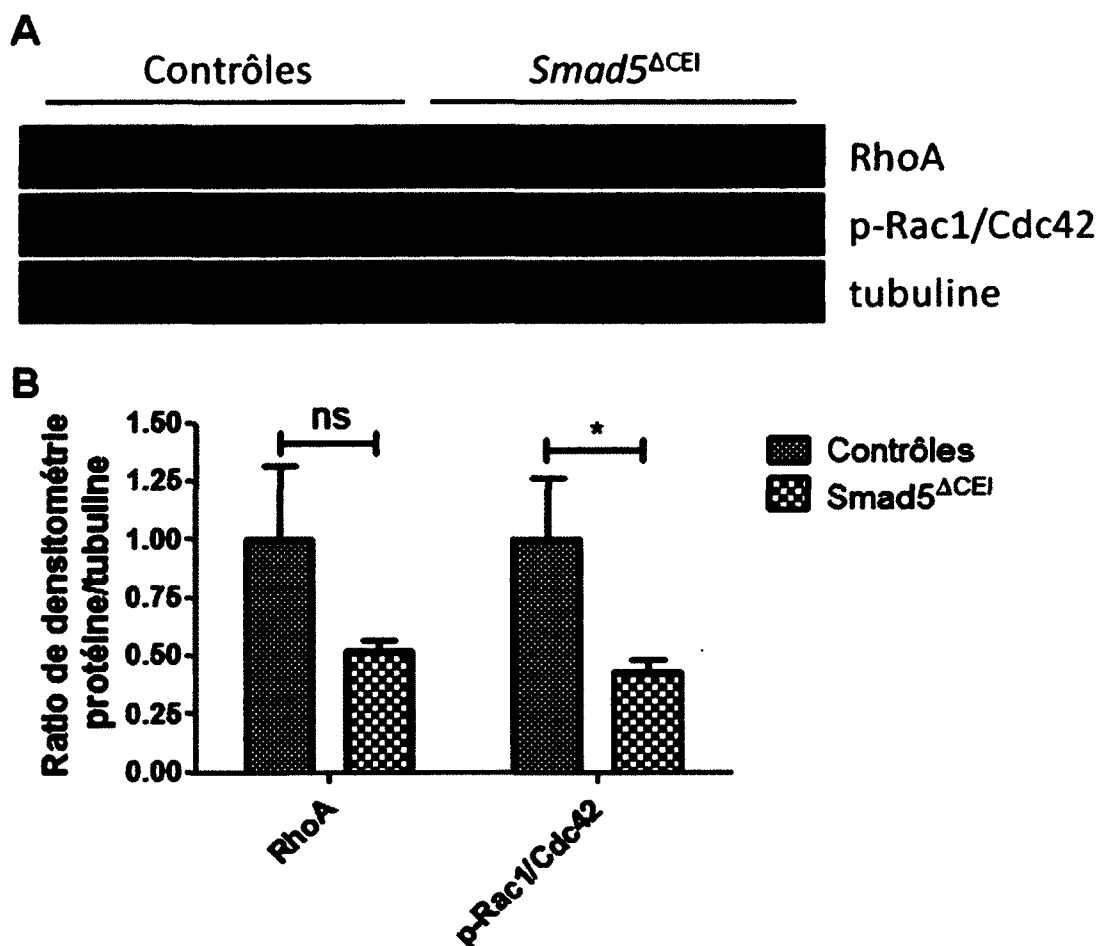
**Figure 17. Impact de la délétion de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* sur la vitesse de migration des cellules épithéliales intestinales**

La migration de l'épithélium intestinal peut être visualisée par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre le BrdU sur des coupes histologiques de jéjunum de souris injectées au BrdU 48 heures avant l'euthanasie. Les cellules épithéliales migrent en 48 heures entre le premier tiers et la moitié de l'axe crypte-villosité chez les souris contrôles (A, D, G). Chez les souris *Smad1<sup>ACEI</sup>*, les cellules migrent jusqu'à la moitié de l'axe crypte-villosité (B). Une augmentation de la vitesse de migration avait été observée chez les souris *Smad5<sup>ACEI</sup>* (E) (Allaire *et al.*, 2011). Une légère diminution de la vitesse de migration est observée suite à la délétion de *Smad8* (H) par rapport aux souris contrôles (G). Le ratio de la distance de migration par rapport à la longueur totale de l'axe crypte-villosité a été effectué afin de déterminer la vitesse de migration des cellules épithéliales intestinales suite

à la délétion de *Smad1* (C), *Smad5* (F) ou *Smad8* (I). Les distances de migration et les longueurs des axes crypte-villosité ont été mesurées à l'aide du logiciel Metamorph (Universal Imaging). ANOVA à 2 voies (C) \*  $p < 0,0292$   $n=3$ , (F, I) \*\*\*  $p < 0,0001$   $n=4$ .

### 3.5.1 Réorganisation du cytosquelette d'actine chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup>

Étant donné que la migration des cellules était augmentée suite à la délétion de *Smad5*, nous avons analysé le statut de différentes protéines impliquées dans la réorganisation du cytosquelette d'actine chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup>. La cofiline, lorsque non phosphorylée, est une protéine impliquée dans la dépolymérisation des filaments d'actine. Une diminution du niveau de la phosphorylation de la cofiline a été observée par immunobuvardage chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> (Allaire *et al.*, 2011). Nous avons ensuite tenté d'analyser les effecteurs capables de phosphoryler (Limk) ou de déphosphoryler (Slingshot phosphatase) la cofiline. Cependant, il reste de la mise au point à faire avec ces anticorps. Les petites protéines G de la famille Rho sont également impliquées dans l'organisation du cytosquelette, l'adhésion et la migration cellulaire. Une diminution de la phosphorylation sur la sérine 71 de Rac1 et Cdc42 ainsi qu'une légère diminution de RhoA ont été observées par immunobuvardage (Figure 18 A). L'analyse en densitométrie a confirmé une diminution significative de deux fois du niveau de Rac1 et Cdc42 phosphorylés sur la sérine 71 (Figure 18 B).



**Figure 18. Implication de Smad5 dans la réorganisation du cytosquelette d'actine**

Immunobuvardages sur des extraits d'enrichissement d'épithélium de jéjunum de souris (A). Une légère diminution de la protéine RhoA est observée chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> par rapport aux contrôles. Une diminution plus importante des niveaux de phosphorylation de Rac1 et Cdc42 est également observée suite à la délétion de *Smad5*. La tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement sur gel. Des analyses en densitométrie ont confirmé la diminution significative des niveaux de p-Rac1/Cdc42 de deux fois chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup>, alors qu'une tendance à la diminution de RhoA est observée (B). Le ratio protéine/tubuline a été normalisé à 1. Mann-Whitney \*  $p < 0,0286$   $n=4$ .

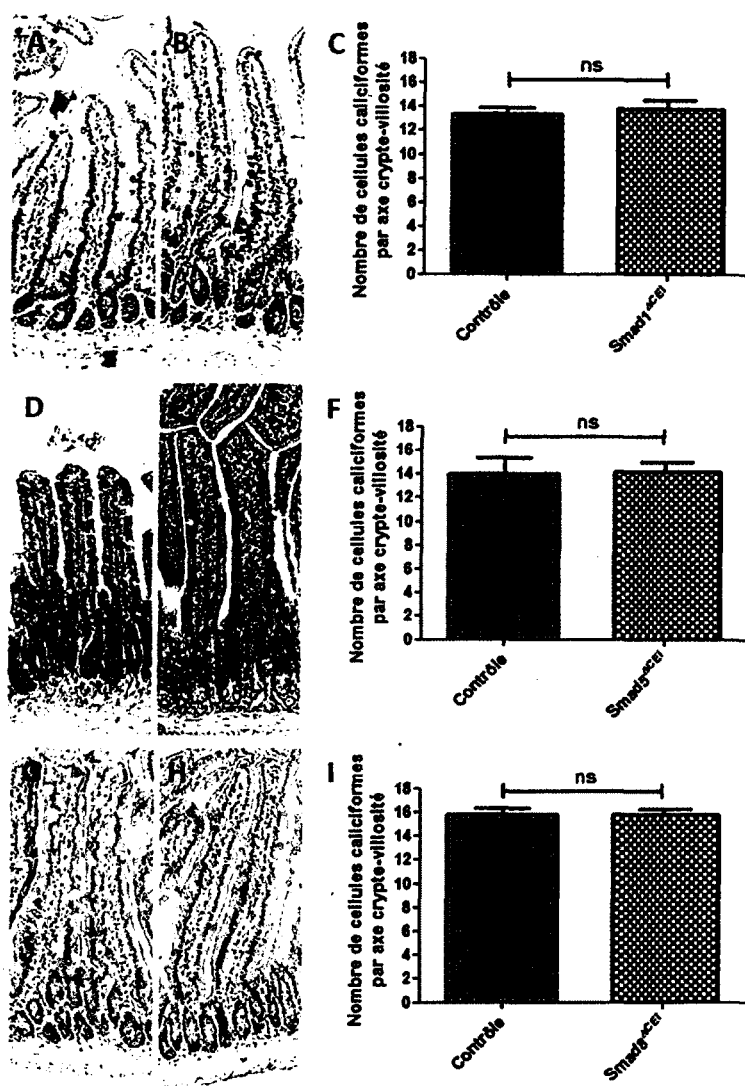
### 3.6 Implication des BR-Smads dans la différenciation des cellules de type sécréteur de l'épithélium intestinal

Une altération de la différenciation des cellules caliciformes et des cellules de Paneth ainsi que des défauts dans la détermination des cellules entéroendocrines avaient été observés chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (Auclair *et al.*, 2007). Nous nous sommes attardés à savoir lequel ou lesquels des BR-Smads étaient impliqués dans ces processus de détermination ou différenciation des cellules de type sécréteur.

#### 3.6.1 Implication de *Smad1* et *Smad5* dans la différenciation des cellules caliciformes

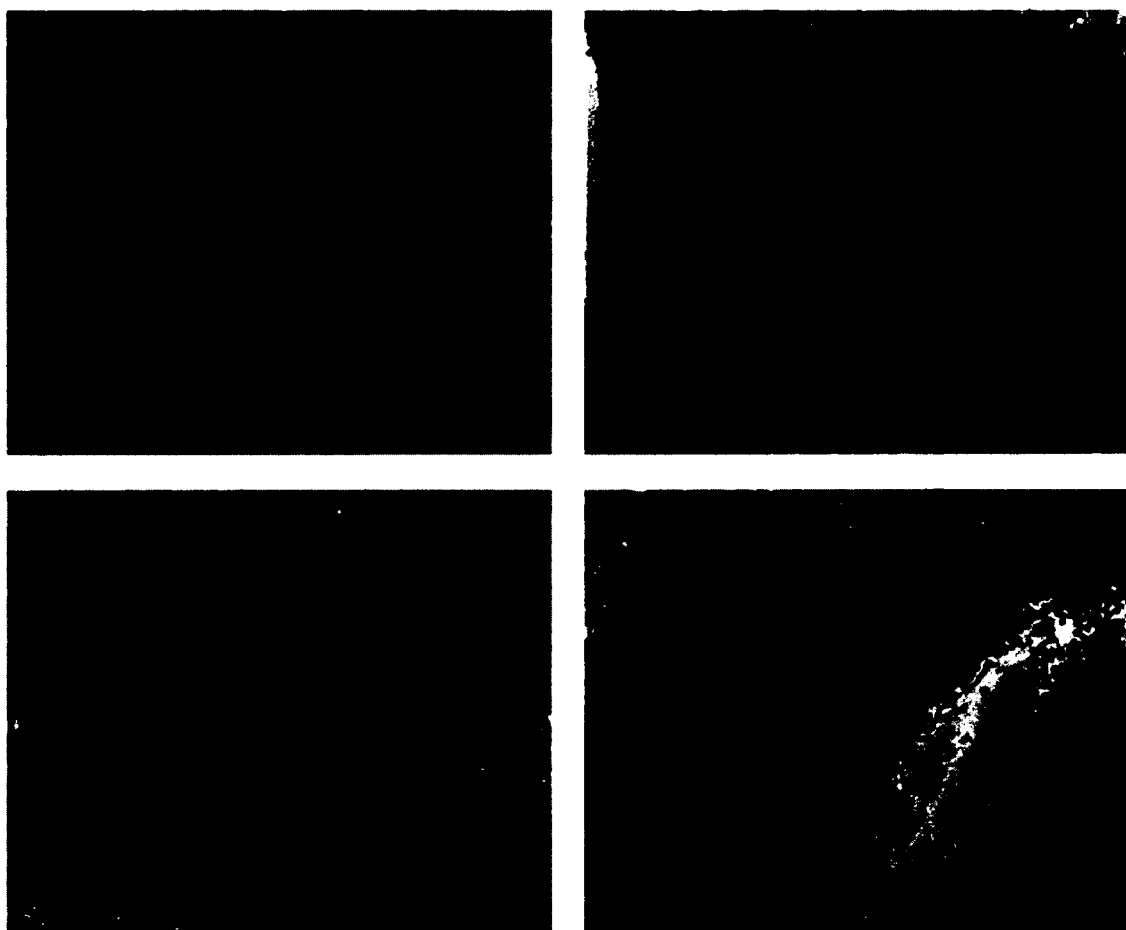
Des colorations à l'alcian bleu, marquant les mucines acides, permettent de visualiser les cellules caliciformes sur des coupes histologiques de jéjunum des souris pour chacun des génotypes. Les cellules caliciformes des souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> et *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> semblent plus petites et plus compactes comparativement aux cellules caliciformes des souris contrôles (Figure 19 A, B, D, E). La délétion de *Smad8* ne semble pas affecter la différenciation des cellules caliciformes (Figure 19 G, H). Des décomptes du nombre de cellules caliciformes par axe crypte-villosité ont été effectués afin de confirmer qu'il n'y avait pas de modulation significative par rapport aux contrôles pour chaque génotype (Figure 19 C, F, I).

Des analyses préliminaires en microscopie électronique ont permis de démontrer que les cellules caliciformes des souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> possédaient des vésicules de mucus plus foncées et légèrement plus petites par rapport aux cellules caliciformes des souris contrôles (Figure 20 A, B). La taille des cellules ne semble toutefois pas affectée par la perte de *Smad1*. La délétion de *Smad5*, quant à elle, n'affecte pas l'apparence des vésicules de mucus, mais les cellules caliciformes semblent plus petites par rapport aux contrôles (Figure 20 C, D).



**Figure 19. Impact de la délétion de *Smad1* ou de *Smad5* sur la différenciation des cellules caliciformes**

Des colorations à l'alcian bleu sur des coupes histologiques de jéjunum de souris ont été effectuées pour visualiser les cellules caliciformes. On peut observer que suite à la délétion de *Smad1* (B) ou de *Smad5* (E), les cellules caliciformes semblent plus petites et compactes par rapport aux cellules caliciformes des souris contrôles (A, D). Le nombre moyen de cellules caliciformes par axe crypte-villosité n'est cependant pas affecté par la délétion de *Smad1* (C) ou *Smad5* (F). La perte de *Smad8* (H) ne semble pas avoir d'effet sur l'apparence ni le nombre de cellules caliciformes au sein de l'axe crypte-villosité (I) par rapport aux contrôles (G). Test de t (C, F, I)  $n=5$ .



**Figure 20. Impact de *Smad1* et *Smad5* sur l'ultra structure des cellules caliciformes**

Les analyses préliminaires de l'ultra structure des cellules caliciformes ont été effectuées par microscopie électronique sur des coupes de jéjunum. Suite à la délétion de *Smad1* (B), les vésicules de mucus semblent plus foncées et compactes comparativement aux cellules caliciformes des souris contrôles (A). Les cellules semblent être en général de la même taille. La délétion de *Smad5* (D) ne semble pas affecter l'apparence des vésicules de mucus, mais on peut remarquer que les cellules caliciformes semblent plus petites par rapport aux contrôles (C). n=2

### 3.6.2 La délétion individuelle des BR-Smads n'affecte pas la détermination des cellules entéroendocrines

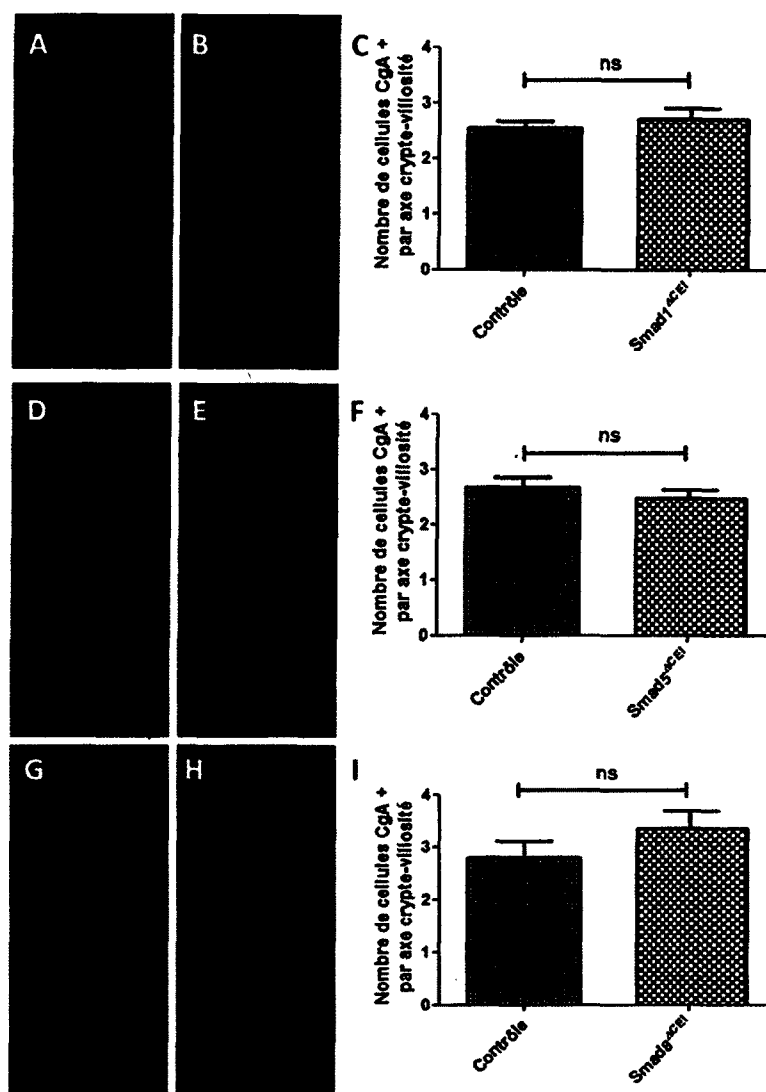
Des immunofluorescences avec un anticorps dirigé contre la chromogranine A permettent de marquer la majorité des cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal. On retrouve en moyenne de 2 à 4 cellules chromogranine A positives par axe crypte-villosité au niveau du jéjunum chez la souris. Aucune modulation significative n'a été observée quant aux nombres de cellules chromogranine A positives par axe crypte-villosité chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>, *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> et *Smad8*<sup>ΔCEI</sup> par rapport à leurs contrôles respectifs (Figure 21 A – I).

### 3.6.3 Implication de *Smad1* dans la différenciation des cellules de Paneth

Afin d'observer les cellules de Paneth, des immunofluorescences avec un anticorps dirigé contre le lysosome ont été effectuées sur des coupes histologiques de jéjunum de souris. Le marquage des granules de lysosome des cellules de Paneth des souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> semble plus diffus et moins bien défini que le marquage observé chez les souris contrôles (Figure 22 A, B). La délétion de *Smad5* ou de *Smad8* n'entraîne aucune variation du marquage du lysosome (Figure 22 D, E, G, H). La localisation des cellules de Paneth et le nombre de cellules par crypte ne sont pas affectés par la perte de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* (Figure 22 A – I).

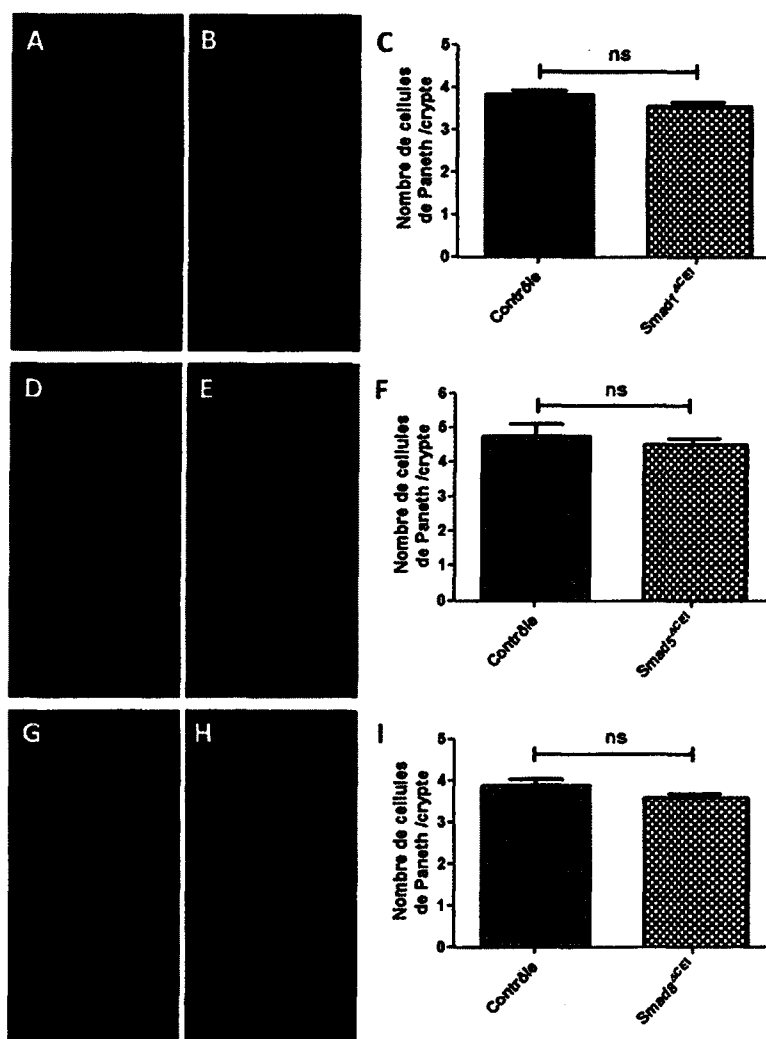
L'analyse de l'ultra structure des cellules de Paneth chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> a été effectuée par microscopie électronique à transmission. Cette analyse a permis de démontrer que les cellules de Paneth des souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> possédaient moins de granule de sécrétion que les cellules de Paneth des souris contrôles (Figure 23).





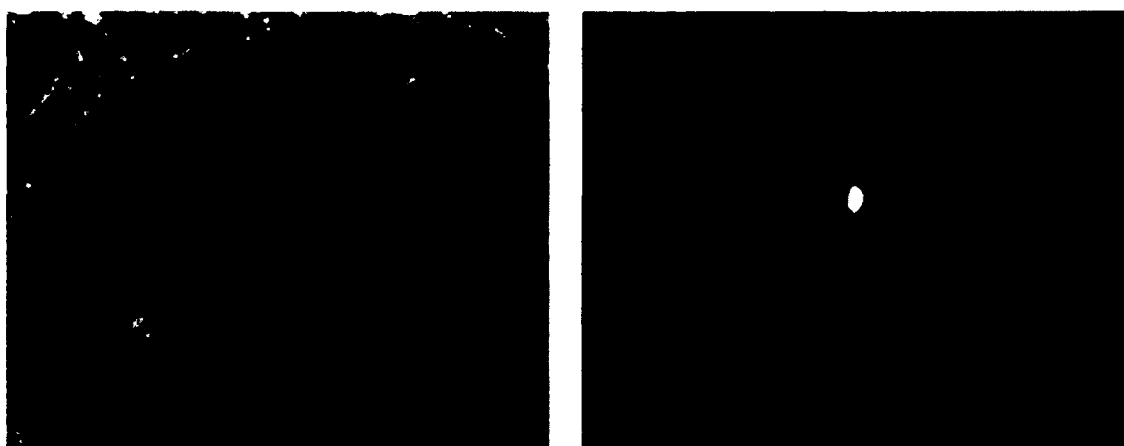
**Figure 21. La délétion individuelle de chaque BR-Smad n'affecte pas la détermination et la différenciation des cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal**

Immunofluorescences avec un anticorps dirigé contre la chromogranine A, permettant de marquer la grande majorité des cellules entéroendocrines de l'épithélium intestinal, sur des coupes histologiques de jéjunum de souris. La délétion de *Smad1* (B), *Smad5* (E) ou de *Smad8* (H) ne semble pas affecter la détermination, ni la différenciation des cellules entéroendocrines par rapport à leurs contrôles respectifs (A, D, G). Des décomptes du nombre de cellules chromogranine A positives par axe crypte-villosité n'ont démontré aucune modulation du nombre de cellules entéroendocrines au niveau de l'épithélium intestinal (C, F, I). Test de t (C, F, I)  $n=5$ .



**Figure 22. Impact de la délétion de *Smad1* sur la différenciation des cellules de Paneth**

Les cellules de Paneth peuvent être visualisées grâce à une immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre le lysosome. Chez les souris *Smad1<sup>ΔCEI</sup>* (B), le marquage du lysosome est plus diffus et plus faible que celui retrouvé chez les souris contrôles (A). Aucune différence n'est observée suite à la délétion de *Smad5* (E) ou de *Smad8* (H) par rapport à leurs contrôles respectifs (D, G). La localisation et le nombre de cellules par crypte ne sont cependant pas affectés par la perte de *Smad1* (B, C), *Smad5* (E, F) ou *Smad8* (H, I). Test de t (C, F, I)  $n=5$ .



**Figure 23. Impact de la délétion de *Smad1* sur l'ultra structure des cellules de Paneth**

L'ultra structure des cellules de Paneth a été analysée par microscopie électronique sur des coupes de jéjunum de souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> (B) et de souris contrôles (A). Une importante diminution du nombre de granules de sécrétion est observée dans les cellules de Paneth des souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> (A) comparativement aux cellules de Paneth des souris contrôles (A). n=2

### **3.7 Récapitulation des phénotypes retrouvés chez les *Smad*<sup>ΔCEI</sup> versus ceux obtenus chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup>**

La plupart de phénotypes observés suite à la délétion de *Bmpr1a* au niveau de l'épithélium intestinal ont été retrouvés chez les souris possédant la délétion individuelle de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8*. Les similitudes observées pour chacun des génotypes sont notées dans le Tableau 9.

**Tableau 9. Récapitulatif des phénotypes observés suite à la délétion de *Smad1*, *Smad5* ou *Smad8* en comparaison avec les phénotypes des souris *Bmpr1a***

	<i>Bmpr1a</i> <sup>ΔCEI</sup>	<i>Smad1</i> <sup>ΔCEI</sup>	<i>Smad5</i> <sup>ΔCEI</sup>	<i>Smad8</i> <sup>ΔCEI</sup>
Longueur cryptes	↑	↑	-	↓
Longueur villosité	↑	↑	↑	-
Nbre de crypte/villosité	↑	↑	-	-
Prolifération	↑	↑	-	-
Migration	↑	-	↑	↓
Caliciforme	Δ	Δ	Δ	-
Entéroendocrine	↓	-	-	-
Paneth	Δ	Δ	-	-

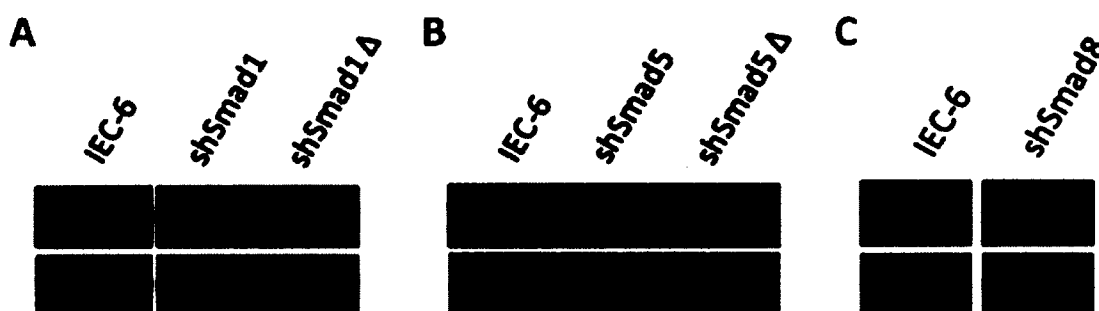
Légende des sigles: ↑ : augmentation, ↓ : diminution, Δ : différenciation affectée

### 3.8 Génération de populations stables de cellules IEC-6 possédant un shARN dirigé contre chacun des BR-Smads

Un modèle cellulaire a été généré afin d'étudier la mécanistique cellulaire dans des processus de prolifération ou de migration des cellules épithéliales intestinales suite à la délétion individuelle de chacun des BR-Smads. Nous avons utilisé les cellules IEC-6 qui sont des cellules épithéliales indifférenciées et prolifératives provenant de crypte d'iléon de rat nouveau-né. Ces cellules sont également très bien caractérisées et utilisées dans des

contextes de régénération et de migration suite à une blessure avec une lame de rasoir par le groupe de Podolsky (Ciacci *et al.*, 1993; Dignass et Podolsky, 1993; Dignass *et al.*, 1994).

Les IEC-6 ont été infectées avec des Lentivirus possédant une construction codant pour des shARN dirigés contre l'ARNm de Smad1, Smad5 ou Smad8 ce qui a permis de générer des lignées de cellules stables exprimant constitutivement un shARN contre un BR-Smad. La diminution causée par ces shARN est d'au moins 50% comparativement au niveau protéique de Smad1, 5 ou 8 des cellules IEC-6 de type sauvage ou des IEC-6 possédant un shARN contrôle (Figure 24).



**Figure 24. Génération de populations stables de cellules IEC-6 exprimant un shARN dirigé contre chacun des BR-Smad**

Immunobuvardage démontrant la diminution des niveaux de phospho-Smad1 (A), phospho-Smad5 (B) ou de Smad8 (C). Une diminution d'environ 50% des niveaux protéiques est observée pour chaque BR-Smad par rapport aux cellules IEC-6 et IEC-6 shSmad $\Delta$  (n=3). La tubuline (bande du bas) a été utilisée comme contrôle de chargement sur gel.

### 3.8.1 Smad5 est impliqué dans la migration des cellules IEC-6

Des blessures ont été effectuées à l'aide d'une lame de rasoir sur une monocouche de cellule. Les cellules, après incubation avec un inhibiteur de la prolifération, sont fixées

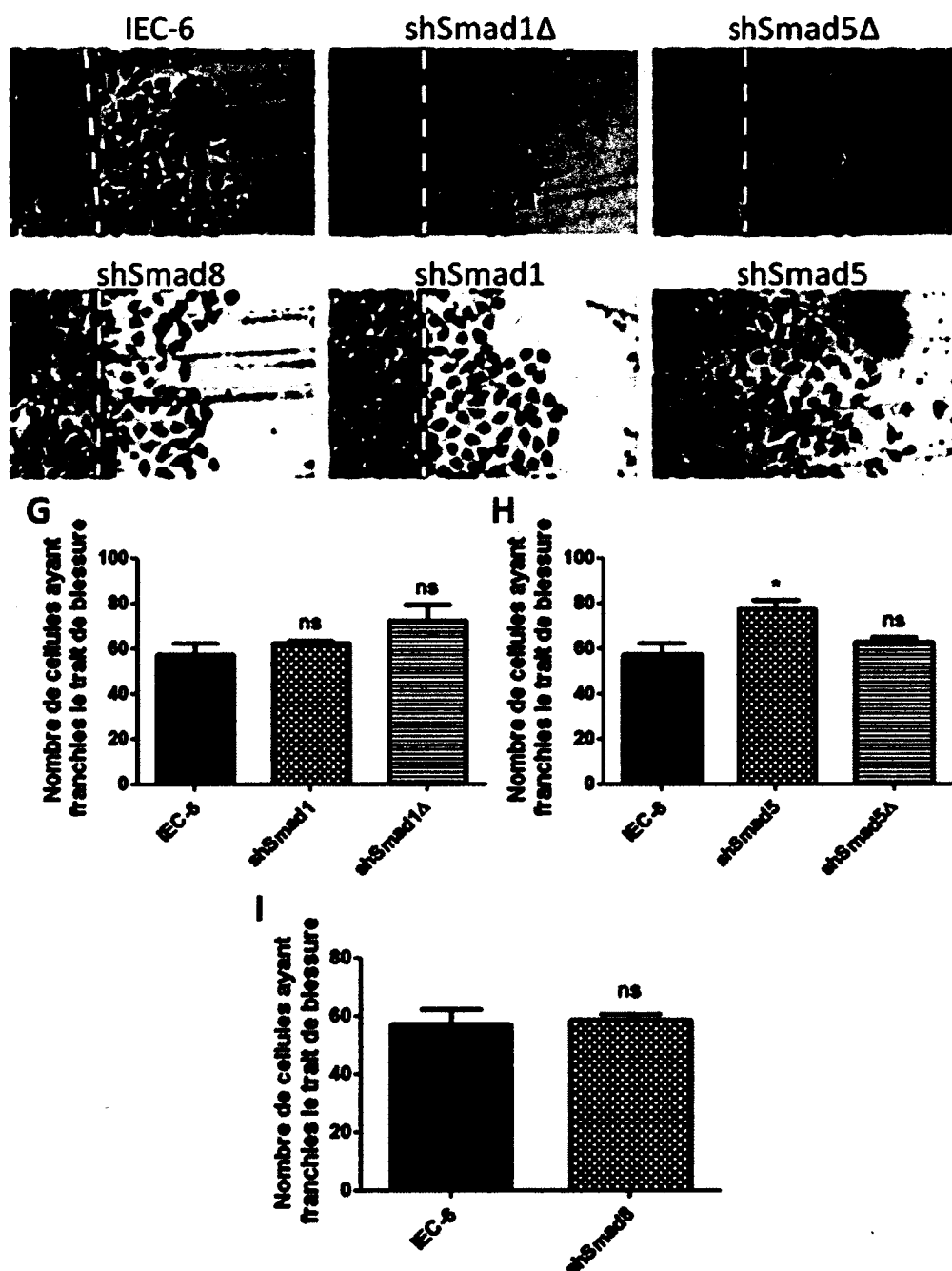
et colorées. En comptant les cellules ayant franchi le trait de blessure après 48 heures de migration, on peut observer une augmentation significative du nombre de cellules en migration chez les cellules IEC-6 shSmad5 comparativement aux cellules IEC-6 et IEC-6 shSmad5Δ (Figure 25 H). La diminution de Smad1 ou Smad8 n'entraîne pas de modulation de la migration des IEC-6 (Figure 25 G, I).

### 3.8.2 Implication de Smad5 dans les étapes d'initiation de la migration cellulaire

Afin de mieux analyser le rôle de Smad5 dans la migration cellulaire, une cinétique de multi-blessure a été effectuée sur des monocouches de cellules IEC-6 afin de recueillir des extraits protéiques à différents temps lors d'un processus de migration cellulaire. Par immunobuvardage, une diminution du niveau de phosphorylation de Smad5 est observée une heure suite aux blessures alors que les cellules commencent à se déplacer (Figure 26). Les niveaux de phosphorylation de Smad1 et Smad8 ainsi que le niveau total de Smad5 ne sont pas modulés lors de la migration des IEC-6 (Figure 26).

### 3.8.3 Implication de Smad1 dans la régulation de la prolifération des cellules IEC-6

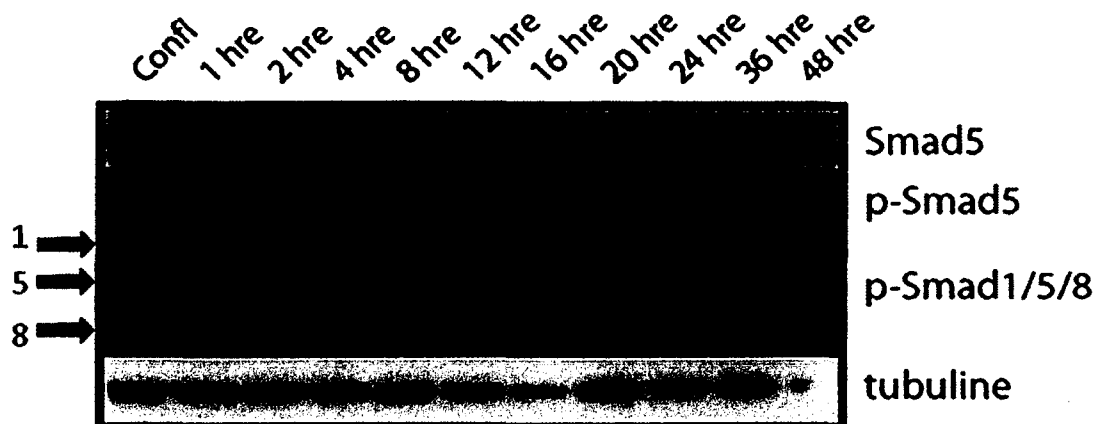
Étant donné qu'une augmentation de la prolifération cellulaire a été observée chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>, une courbe de prolifération cellulaire a été effectuée avec les cellules IEC-6 et IEC-6 shSmad pour valider ce résultat *in vitro*. La diminution de Smad5 ou Smad8 n'affecte pas la prolifération tandis que la diminution de Smad1 avec un shARN entraîne une augmentation de la prolifération des IEC-6 (Figure 27).



**Figure 25. La diminution de Smad5 entraîne une augmentation de la migration des cellules IEC-6**

Des blessures sont effectuées avec une lame de rasoir sur une monocouche de cellules confluentes exprimant différents shARN (A – F). Seule la diminution de Smad5 (F) affecte la migration des cellules comparativement aux cellules IEC-6 (A) et shSmad5Δ (C). La diminution de Smad1 (E) ou de Smad8 (D) n'ont aucun impact sur la migration cellulaire

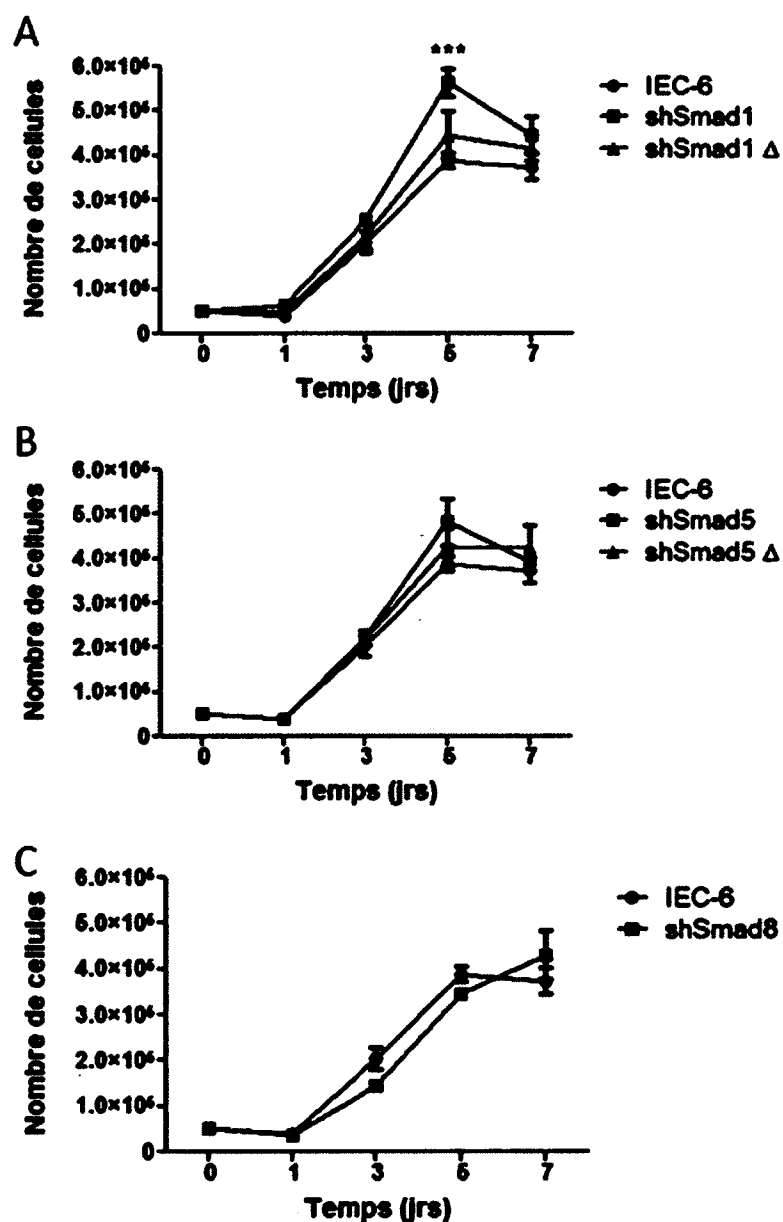
des cellules IEC-6 tout comme le shSmad1Δ (B). Le trait de blessure est identifié par un trait pointillé (A – F). Des décomptes du nombre de cellules ayant franchies le trait de blessure ont été effectués et ont permis de confirmer l'augmentation du nombre de cellules migratoires suite à la diminution de Smad5 avec un shARN (H). Test de t \*  $p < 0,04$  (n=3 infections différentes par shARN).



**Figure 26. Implication de Smad5 dans l'initiation de la migration cellulaire des cellules IEC-6**

Immunobuvardage sur des extraits protéiques provenant d'une cinétique de multi-blessure avec les cellules IEC-6. L'hydroxyurée a été ajouté au milieu de culture (2 mM) afin d'inhiber la prolifération cellulaire. Une diminution de l'activité de Smad5 (phospho-Smad5) est observée deux heures après les blessures et le niveau de phospho-Smad5 reste faible jusqu'à 12 heures après les blessures. Le niveau des phospho-Smad1 et phospho-Smad8 reste inchangé au cours de la migration des cellules IEC-6. Le niveau protéique total de Smad5 est également inchangé. La tubuline a été utilisée comme contrôle de chargement sur gel. (n=1)





**Figure 27. La diminution de Smad1 entraîne une augmentation de la prolifération chez les cellules IEC-6**

Courbe de prolifération cellulaire effectuée avec les cellules IEC-6 exprimant un shARN contre Smad1 (A), Smad5 (B) ou Smad8 (C). 50 000 cellules ont étéensemencées au départ. Seule la diminution de Smad1 entraîne une augmentation de la prolifération des cellules (A) par rapport aux cellules IEC-6 et IEC-6 shSmad1 $\Delta$ . La diminution de Smad5 ou Smad8 n'ont aucun effet significatif sur la prolifération cellulaire des IEC-6 (B, C). ANOVA à 2 voies \*\*\*  $p < 0,0001$  ( $n=3$  infections différentes par shARN).

## IV. Discussion

Beaucoup de rôles et fonctions ont été associés à la voie des Bmps. Cependant, peu d'études ont identifié lequel ou lesquels des BR-Smads étaient impliqués pour une fonction précise. Nous avons donc voulu identifier lequel ou lesquels des BR-Smads étaient responsables des phénotypes observés suite à la délétion de la signalisation des Bmps au niveau des cellules épithéliales intestinales chez les souris *Bmpr1a*<sup>ACEI</sup>.

### 4.1 Impact de la délétion individuelle des BR-Smads sur l'architecture de l'axe crypte-villosité

Une augmentation de la longueur de la crypte et de la villosité avait été observée chez les souris *Bmpr1a*<sup>ACEI</sup> (Auclair *et al.*, 2007) alors que seulement une augmentation de la longueur de la villosité était observée suite à la délétion de *Smad5* (Allaire *et al.*, 2011). Mes résultats ont permis de démontrer que seul *Smad1* était responsable de l'augmentation de la longueur du compartiment cryptal, via une dérégulation de la prolifération, alors que la délétion de *Smad8* entraîne une minime diminution de la longueur de la crypte.

#### 4.1.1 *Smad1* et son rôle dans la prolifération cellulaire

Des analyses de la prolifération de l'épithélium intestinal par incorporation de BrdU ont permis de démontrer que *Smad1* était l'effecteur de la voie des Bmps impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium intestinal. Une autre étude au sein de l'épithélium pulmonaire avait également obtenu une augmentation de la prolifération suite à la délétion de *Smad1*, mais pas de *Smad5* (Xu *et al.*, 2011). Une augmentation du nombre de cryptes par villosité a également été notée seulement chez les souris *Smad1*<sup>ACEI</sup>. De plus, cette augmentation du nombre de cryptes par villosité a été

analysée en deux dimensions. Donc, dans un tissu en trois dimensions, cette augmentation s'avère plus importante et significative.

Il a également été démontré que la voie des Bmps était impliquée dans le maintien de la niche des cellules souches (He *et al.*, 2004). Nous avons donc analysé les niveaux d'expression de marqueurs spécifiques pour chacun des deux types de cellules souches de l'épithélium intestinal chez les souris *Smad1*<sup>ACEI</sup> car les cellules souches sont les principaux acteurs de la prolifération et de la formation des cryptes (fission cryptale). Le niveau d'expression de *Bmi1*, marquant les cellules souches quiescentes en position +4 (Sangiorgi et Capecchi, 2008), n'est pas modulé suite à la perte de *Smad1*. Le niveau d'expression de *Lgr5*, marqueur des cellules souches actives (CBC) (Barker *et al.*, 2007), présente une tendance à l'augmentation quoique non significative. Cette tendance à l'augmentation pourrait être causée par le fait qu'il y a plus de cryptes intestinales et que chacune de ces cryptes comporte des cellules souches actives. En augmentant le nombre d'individus, il serait possible de mieux définir cette tendance à l'augmentation. Les cellules de Paneth ont été démontrées comme étant essentielles au maintien de la niche des cellules souches *Lgr5*<sup>+</sup> (Sato *et al.*, 2011). Est-ce que les défauts dans la détermination des cellules de Paneth observés suite à la délétion de *Smad1* pourraient affecter la niche des cellules souches *Lgr5*<sup>+</sup>? Il serait intéressant d'effectuer une immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre *Lgr5* chez les souris *Smad1*<sup>ACEI</sup> ce qui nous permettrait de visualiser les cellules *Lgr5*<sup>+</sup> suite à la délétion de *Smad1* pour vérifier cette hypothèse.

Tout comme chez les souris *Bmpr1a*<sup>ACEI</sup>, une augmentation des niveaux protéiques de la cycline D1 a été observée suite à la délétion de *Smad1*. Comme mentionné précédemment, une étude récente du groupe de Shi a démontré que *Wif1* était un gène cible de *Smad1* au niveau de l'épithélium pulmonaire. De plus, les auteurs ont démontré que l'augmentation de la prolifération de l'épithélium pulmonaire suite à la perte de *Smad1* était dépendante la transcription de *Wif1* par *Smad1* (Xu *et al.*, 2011). *Smad1* jouerait un rôle dans le contrôle de la prolifération cellulaire via la transcription de *Wif1*, qui à son tour inhiberait la voie Wnt. Suite à la délétion de *Smad1*, *Wif1* n'étant plus exprimé, la voie Wnt

est alors suractivée ce qui mène à une hyper-prolifération cellulaire. Il serait donc très intéressant d'analyser le niveau d'expression de *Wif1* et le statut de la voie Wnt dans l'épithélium intestinal des souris *Smad1*<sup>ACEI</sup>. Des analyses en PCR quantitatif permettront également de déterminer si l'augmentation du niveau protéique de la cycline D1 observée est due à une augmentation transcriptionnelle ou à une meilleure stabilisation de la protéine.

Il a également été démontré que la voie des Bmps inhibait la prolifération cellulaire en entraînant une augmentation du niveau protéique de p21<sup>Cip</sup> et p27<sup>Kip</sup> dans plusieurs types cellulaires (Ghosh-Choudhury *et al.*, 2000; Jeffery *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2009). L'interaction de p21<sup>Cip</sup> ou de p27<sup>Kip</sup> avec les complexes Cdk4,6/cycline D et Cdk2/cycline E empêche l'hyper-phosphorylation de Rb par les Cdk, laquelle est essentielle au passage G1/S du cycle cellulaire (Niculescu *et al.*, 1998). Le niveau protéique de p27<sup>Kip</sup> n'est pas modulé suite à la délétion de *Smad1*, mais qu'en est-il de p21<sup>Cip</sup>? Des analyses du niveau protéique de p21<sup>Cip</sup> chez les souris *Smad1*<sup>ACEI</sup> seront à effectuer afin de déterminer si la perte de *Smad1* a un impact sur l'expression ou le niveau protéique de p21<sup>Cip</sup> au niveau de l'épithélium intestinal.

Afin de valider le rôle de Smad1 dans la prolifération de l'épithélium intestinal, une courbe de prolifération cellulaire a été effectuée avec les IEC-6 et IEC-6 shSmad. Comme chez la souris, seule la diminution de Smad1 entraîne une augmentation de la prolifération des cellules épithéliales intestinales. Ce résultat supporte le rôle de Smad1 dans la régulation de la prolifération des cellules épithéliales intestinale. Toutefois, les cellules IEC-6 shSmad1 arrêtent de proliférer à l'atteinte de la confluence démontrant que l'inhibition par contact n'est pas affectée par la diminution de Smad1.

Malgré un nombre plus élevé de cryptes et une augmentation de la prolifération de l'épithélium, aucune polypose n'a été observée chez les souris *Smad1*<sup>ACEI</sup>. La perte de

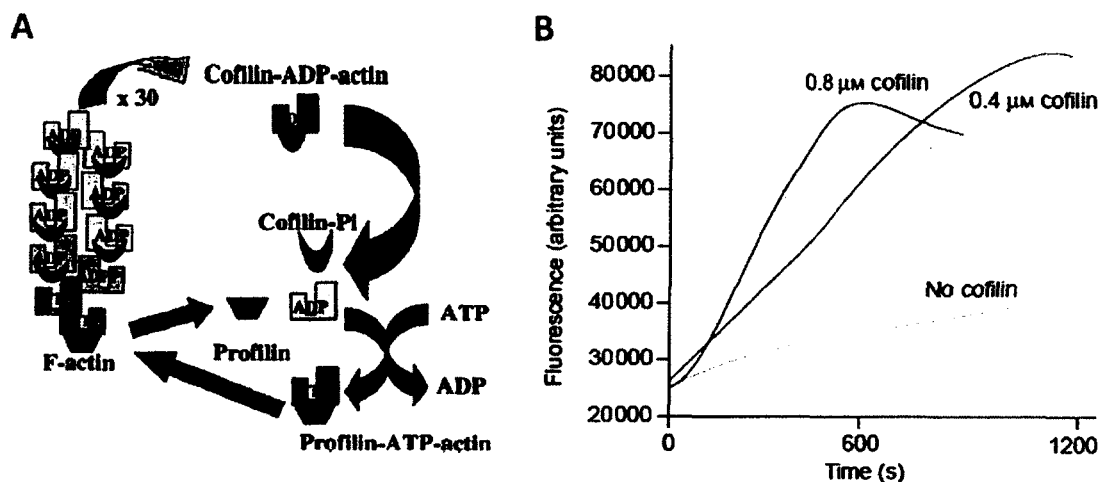
*Smad1*, et même de *Bmpr1a* (Auclair *et al.*, 2007), au niveau de l'épithélium intestinal n'est pas suffisante pour induire la polypose. Cependant, il serait intéressant de croiser les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> avec les souris *APC*<sup>MIN/+</sup>. La mutation d'*APC* entraîne une suractivation de la voie Wnt/β-caténine qui résulte au développement d'une polypose chez la souris à l'âge de 4 mois suite à la perte du second allèle du gène *APC* (perte d'hétérogénéité) (Moser *et al.*, 1990). Une étude récente a démontré l'implication de *Smad1* dans l'activation de la transcription de *Wif1* (*Wnt inhibitory factor 1*), un inhibiteur extracellulaire de la voie Wnt (Xu *et al.*, 2011). La délétion de *Smad1* au niveau de l'épithélium pulmonaire induisait une dérégulation de la prolifération cellulaire via une suractivation de la voie Wnt/β-caténine (Xu *et al.*, 2011). Donc, si *Smad1* est également impliqué dans l'activation de la transcription de *Wif1* au niveau de l'épithélium intestinal et que les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> sont croisées avec les souris *APC*<sup>MIN/+</sup>, on pourrait s'attendre à observer le développement d'une polypose plus rapidement, car la perte de *Smad1* pourrait potentialiser la suractivation de la voie Wnt/β-caténine et accélérer ainsi le développement de la polypose chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>; *APC*<sup>MIN/+</sup> par rapport aux souris *APC*<sup>MIN/+</sup>.

#### 4.1.2 *Smad5* et son rôle dans la migration cellulaire

Une augmentation de la vitesse de migration des cellules épithéliales le long de l'axe crypte-villosité avait été observée chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> (Allaire *et al.*, 2011). Des analyses de migration par incorporation de BrdU ont démontré une diminution de la vitesse de migration suite à la délétion de *Smad8*. Étant donné que le résultat inverse a été observé chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup>, il serait intéressant d'analyser les niveaux d'expression de *Smad5* chez les souris *Smad8*<sup>ΔCEI</sup> afin de vérifier s'il y a une compensation par *Smad5* suite à la perte de *Smad8*. La délétion de *Smad1*, quant à elle, n'entraîne pas d'augmentation de la vitesse de migration en tant que telle. Cependant, l'augmentation de la prolifération cellulaire pourrait faire en sorte que les cellules épithéliales sont poussées le long de la villosité par les nouvelles cellules qui sortent des cryptes. De plus, aucune augmentation de la migration cellulaire n'a été observée suite à la diminution de *Smad1* chez les cellules IEC-6 en présence d'un inhibiteur de la prolifération. Aucune modulation de la migration

cellulaire n'a été observée chez les cellules shSmad8 contrairement à ce qui avait été observé chez la souris. Des analyses plus approfondies seront nécessaires afin de déterminer si Smad8 a bel et bien un rôle dans la migration cellulaire ou s'il s'agit d'une compensation par Smad5 *in vivo*.

Nous nous sommes par la suite intéressés à l'état de la réorganisation du cytosquelette d'actine chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> car la réorganisation du cytosquelette d'actine est la clé de la migration cellulaire (dos Remedios *et al.*, 2003). Une diminution de la phosphorylation sur la sérine 3 de la cofiline avait été démontrée chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> (Allaire *et al.*, 2011). Lorsqu'elle est sous sa forme non phosphorylée, la cofiline est active et déstabilise les microfilaments d'actine permettant ainsi un recyclage de l'actine globulaire et augmente la vitesse de polymérisation et de dépolymérisation de l'actine (Figure 28) (Agnew *et al.*, 1995; Bamburg, 1999). La cofiline est également un élément clé de la migration dirigée des cellules (Ghosh *et al.*, 2004). Une tendance à la diminution de RhoA a été observée suite à la délétion de *Smad5*. RhoA est une protéine impliquée entre autres dans la contractilité actine-myosine, dans la formation des fibres de stress et la formation des points focaux d'adhésion (Spiering et Hodgson, 2011). Il a été démontré qu'une suractivation de RhoA entraînait une diminution de la migration cellulaire due à une présence plus élevée de points focaux d'adhésion (Cetin *et al.*, 2004). RhoA est également impliqué dans la phosphorylation et l'inactivation de la cofiline via ROCK et la Lim kinase. Une diminution de RhoA pourrait alors affecter la formation des points focaux d'adhésion et augmenter la réorganisation du cytosquelette d'actine facilitant ainsi la migration cellulaire.



**Figure 28 : Augmentation de la vitesse de polymérisation par la cofiline**

Schéma représentant la dépolymérisation des microfilaments d'actines par la cofiline. L'actine globulaire peut alors être recyclée par la Profiline et être réutilisée dans la polymérisation des microfilaments d'actine (A). Augmentation de la vitesse de polymérisation de l'actine suite à l'ajout de la cofiline (B). Figure A tirée de dos Remedios *et al.*, 2003 et la figure B est tirée de Condeelis, 2001.

Une diminution du niveau de phosphorylation sur la sérine 71 de Rac1 et Cdc42 a également été démontrée suite à la perte de *Smad5*. Rac1 et Cdc42 sont phosphorylés sur la sérine 71 par Akt et cette phosphorylation inhibe la liaison du GTP à ces deux petites protéines G diminuant donc leur activité (Kwon *et al.*, 2000). Chez les souris *Smad5*<sup>ACE1</sup>, Rac1 et Cdc42 seraient donc moins inactivés permettant ainsi une augmentation de leur activité. Rac1 peut entre autres activer la phosphatase Slingshot, effectrice majeure de la déphosphorylation et l'activation de la cofiline et d'un autre côté activer la Lim kinase qui elle inhibe la cofiline (Spiering et Hodgson, 2011). Rac1 et Cdc42 sont également impliqués dans l'activation des protéines Wasp et Wave qui peuvent à leur tour activer le complexe Arp2/3 (Spiering et Hodgson, 2011). Le complexe Arp2/3 permet la formation d'embranchement des microfilaments d'actine essentielle à la formation des protusions de la membrane cellulaire lors de la migration des cellules. Une augmentation de l'activité de Rac1 et de Cdc42 pourrait alors favoriser la formation des ramifications des microfilaments d'actine augmentant ainsi la rapidité de la formation de protusions de la membrane

plasmique des cellules ce qui favoriserait la migration cellulaire. La réorganisation du cytosquelette dépend de la localisation de chaque protéine impliquée, mais est également modulée dans le temps et l'espace ce qui complexifie grandement l'étude et l'analyse de celle-ci. D'autres études plus poussées sur la localisation en temps réel dans la cellule des différentes protéines impliquées sont nécessaires afin de mieux comprendre la fine régulation de ce processus cellulaire.

Plusieurs autres molécules peuvent activer la phosphatase Slingshot comme la PKC, le cAMP, Akt et la Calcineurine A (Meberg *et al.*, 1998; Zhan *et al.*, 2003; Nishita *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005). Des analyses bio-informatiques ont d'ailleurs permis d'observer la présence de trois sites de liaison potentiels des BR-Smads sur le promoteur de la *Calcineurine A*. La Calcineurine A est activée suite à l'augmentation de calcium intracellulaire libre ce qui entraîne l'activation de la phosphatase Slingshot qui peut alors déphosphoryler la cofiline (Wang *et al.*, 2005). Il serait intéressant d'analyser d'une part le niveau d'expression de la *Calcineurine A* et d'une autre part le niveau de calcium intracellulaire suite à la délétion de *Smad5*. Une étude a démontré il y a quelques années que l'activation de Rac1 entraînait une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire et que ce processus était essentiel à la migration des cellules IEC-6 suite à une blessure (Rao *et al.*, 2008).

Des tests de blessures sur une monocouche de cellules IEC-6 et IEC-6 shSmad ont confirmé que la diminution de Smad5 augmentait de la migration des cellules épithéliales intestinales. De plus, une cinétique de multi-blessures avec les cellules IEC-6 de type sauvage a permis de démontrer que la diminution de l'activité de Smad5 était impliquée dans les étapes d'initiation de la migration cellulaire. Ce résultat confirme et précise l'implication de Smad5 dans le contrôle de la migration cellulaire. Des études subséquentes sur l'activité et la localisation des petites protéines G de la famille Rho, mais également des diverses protéines impliquées dans la régulation de l'activité de la cofiline permettront de mieux caractériser et comprendre le rôle de Smad5 dans ce processus cellulaire.



## 4.2 Implication des BR-Smads dans la différenciation et la détermination des cellules de type sécréteur

La perte de la signalisation épithéliale des Bmps au niveau de l'intestin entraînait des défauts dans la détermination des cellules entéroendocrines ainsi que des défauts dans la différenciation des cellules caliciformes et des cellules de Paneth (Auclair *et al.*, 2007). Par contre, le ou les BR-Smads impliqués dans ces processus n'avaient pas été identifiés. Afin de déterminer lequel ou lesquels des BR-Smads étaient impliqués dans la détermination et la différenciation des cellules sécrétrices, différents marquages ou colorations ont été effectués pour visualiser et analyser ces cellules.

### 4.2.1 Smad1 et Smad5 sont impliqués dans la différenciation des cellules caliciformes

Les cellules caliciformes semblent plus petites et plus compactes chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> et *Smad5*<sup>ΔCEI</sup>, mais aucune différence du nombre de cellule suggérant des défauts dans la différenciation de ces cellules. Ce phénotype avait également été observé suite à la délétion de *Bmpr1a* au niveau de l'épithélium intestinal (Figure 9 A, B) (Auclair *et al.*, 2007). Des analyses préliminaires de l'ultra structure des cellules caliciformes par microscopie électronique ont permis d'observer que chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>, les vésicules de mucus étaient plus foncées et compactes, mais que les cellules semblaient en général de la même taille comparativement aux cellules caliciformes des souris contrôles. La délétion de *Smad5*, quant à elle, ne semble pas entraîner de modification des vésicules de mucus, mais semble entraîner une diminution de la taille des cellules. La délétion de *Smad8* ne semble pas avoir d'effet sur la différenciation des cellules caliciformes. Les défauts dans la différenciation des cellules caliciformes observés chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> seraient donc médiés par *Smad1* et *Smad5* chacun ayant son rôle distinct dans ce processus. Des défauts dans la différenciation des pneumocytes de type II, responsables de la sécrétion du surfactant, ont également été observés suite à la délétion de *Smad1* au niveau de l'épithélium pulmonaire (Xu *et al.*, 2011). Ces résultats obtenus au niveau du poumon ainsi que ceux obtenus au niveau de l'épithélium intestinal suggèrent un rôle

important de Smad1 dans la différenciation et le maintien du statut différencier des cellules épithéliales sécrétrices. Plusieurs gènes ont été démontrés importants pour la différenciation des cellules caliciformes tels que *Klf4*, *Muc2*, *Tff3* (Podolsky *et al.*, 1993; Katz *et al.*, 2002). L'expression de *Klf4* et de *Tff3* était réduite chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (Auclair *et al.*, 2007), il serait intéressant d'analyser lequel entre Smad1 et Smad5 est responsable de l'expression de chacun de ces gènes. L'analyse bio-informatique des promoteurs de ces gènes permettrait également de vérifier si l'expression de ces gènes est modulée directement par Smad1 ou Smad5 via la présence de site de liaison des BR-Smads (BRE). Des analyses préliminaires n'ont cependant pas détecté de sites potentiels dans le promoteur de ces gènes.

#### **4.2.2 La détermination des cellules entéroendocrines dépend de plus d'un BR-Smad à la fois**

Une diminution du nombre de cellules entéroendocrines et du niveau d'expression de la *Neurogenine 3* avaient été observés chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> suggérant un défaut dans la détermination de ces cellules à partir du précurseur de la voie sécrétrice (Figure 9 E, F) (Auclair *et al.*, 2007). Ce phénotype n'a cependant pas été observé suite à la délétion individuelle de chacun des BR-Smads. Deux possibilités s'imposent : soit la détermination des cellules entéroendocrines nécessite plus d'un BR-Smad et n'est pas affectée par la perte d'un seul BR-Smad, soit il y a compensation par un autre BR-Smad. Aucune modulation de l'expression de *Smad1* et *Smad8* n'avait été observée chez les souris *Smad5*<sup>ΔCEI</sup> (Allaire *et al.*, 2011). Aucune modulation des niveaux de Smad1 et Smad8 phosphorylés avait été observée suite à la délétion de *Smad5*. Par contre, cette vérification du niveau d'expression ou de l'activation protéique n'ont pas été effectués chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup> et *Smad8*<sup>ΔCEI</sup>. De plus, les BR-Smads peuvent former différentes combinaisons avec Smad4 (Smad1-Smad1, Smad1-Smad5, Smad1-Smad8, etc.). Il se pourrait donc que la perte d'un seul Smad soit compensée par son partenaire au niveau d'un promoteur X. Il serait donc intéressant d'analyser ces hypothèses.

#### 4.2.3 Smad1 est le seul BR-Smad impliqué dans la différenciation des cellules de Paneth

La voie de signalisation des Bmps au niveau de l'épithélium intestinal a également été démontrée comme jouant un rôle dans la différenciation des cellules de Paneth (Auclair *et al.*, 2007). Aucune modulation des cellules de Paneth n'a été observée suite à la délétion de *Smad5* ou *Smad8*. La localisation et le nombre de cellules par cryptes ne sont pas affectés par la perte individuelle des BR-Smads démontrant que la détermination de ces cellules se produit normalement chez ces souris. Par contre, suite à la délétion de *Smad1*, le marquage du lysosome est plus faible et diffus à l'intérieur des cellules de Paneth suggérant un défaut dans la différenciation de ces cellules. Ce phénotype est identique à celui observé chez les souris *Bmpr1a*<sup>ΔCEI</sup> (Figure 9 C, D) (Auclair *et al.*, 2007). Smad1 serait le principal effecteur de la voie des Bmps impliqué dans la différenciation des cellules de Paneth. Il serait intéressant d'analyser le niveau d'expression des différents gènes impliqués dans la différenciation de ces cellules tels que *MMP7*, *Cryptdine*, *Lysosyme* et *Sox9* (van Es *et al.*, 2005; Weeks *et al.*, 2006; Bastide *et al.*, 2007). L'expression de *MMP7*, *Cryptdine* et *Lysosyme* était considérablement réduite suite à la perte de *Bmpr1a* au niveau de l'épithélium intestinal (Auclair *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant d'analyser le niveau d'expression de ces quatre gènes chez les souris *Smad1*<sup>ΔCEI</sup>, mais également d'analyser leur séquence promotrice à la recherche de site de liaison BRE.

La voie de signalisation Wnt est essentielle à la différenciation des cellules de Paneth (van Es *et al.*, 2005). Il existe plusieurs signalisations croisées entre la voie Wnt et la voie des Bmps (Itasaki et Hoppler, 2010). La suractivation de la voie Wnt, suite à la délétion de *Smad1* au niveau de l'épithélium pulmonaire chez la souris, affectait la différenciation des cellules épithéliales (Xu *et al.*, 2011). Il a également été démontré que Smad1 pouvait interagir avec Tcf et que cette interaction permettait la transcription de gènes cibles spécifiques seulement si Smad1 et Tcf étaient présents sous forme d'un complexe (Theil *et al.*, 2002). Il serait intéressant d'évaluer le statut de la voie Wnt au niveau des cellules de Paneth suite à la délétion de *Smad1*. De plus, la voie de Wnt ainsi

que la présence des cellules de Paneth sont essentielles au maintien de la niche des cellules souches (Korinek *et al.*, 1998; He *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2011). La voie Wnt est essentielle au maintien du statut indifférencié et prolifératif des cellules souches épithéliales intestinales (Korinek *et al.*, 1998; Scoville *et al.*, 2008).

#### 4.3 Compensation et dosage entre les divers BR-Smads

Il serait intéressant d'évaluer s'il y a compensation soit au niveau de l'expression ou soit au niveau de l'activation des deux autres BR-Smads suite à la délétion d'un BR-Smad particulièrement dans le cas de la délétion de *Smad8*. Une légère diminution de la longueur du compartiment cryptal ainsi qu'une légère tendance à la baisse du nombre de cellules prolifératives pourraient être causées par une suractivation de *Smad1* chez les souris *Smad8*<sup>ΔCEI</sup>. La diminution de la vitesse de migration chez les souris *Smad8*<sup>ΔCEI</sup> pourrait être liée à une augmentation de l'activité de *Smad5*. La délétion de deux ou de trois BR-Smads en même temps à l'aide des IEC-6 shSmad permettra de mieux éclaircir cette hypothèse.

La délétion classique de *Smad1* ou *Smad5* chez la souris est létale *in utero*, mais les souris hétérozygotes sont viables et ne présentent aucun défaut majeur (Chang *et al.*, 1999; Tremblay *et al.*, 2001; Arnold *et al.*, 2006). Cependant, les hétérozygotes pour *Smad1* et *Smad5* meurent *in utero* et présentent la plupart des phénotypes similaires aux délétions individuelles de *Smad1* et *Smad5* (Arnold *et al.*, 2006). Les hétérozygotes pour *Smad1* et *Smad8* ou *Smad5* et *Smad8* étaient viables et aucun défaut majeur n'a été observé chez ces souris. Les résultats obtenus par cette étude démontraient la présence d'un dosage entre les différents BR-Smads au sein de divers processus cellulaires. *Smad1* et *Smad5* auraient donc des rôles distincts l'un de l'autre, mais auraient également des rôles complémentaires dépendamment du type et des fonctions cellulaires, alors que *Smad8* aurait des rôles plus discrets, et ce dans des types cellulaires en particulier (Arnold *et al.*, 2006).

Des analyses plus approfondies sur les rôles de Smad8 au niveau de l'épithélium intestinal seront à effectuer afin de mieux comprendre l'implication de Smad8 dans les diverses fonctions cellulaires. Il faudrait également évaluer les interactions possibles entre les différents BR-Smads dans les différentes fonctions cellulaires.

#### **4.4 Rôles de la voie non canonique des Bmps**

Il n'est pas à exclure que la voie Smad indépendante joue un rôle dans la détermination et la différenciation des cellules sécrétrices de l'épithélium intestinal. Cette voie de signalisation est initiée au niveau de la queue cytoplasmique du récepteur des Bmps de type II et les principaux effecteurs de cette voie sont la p38 MAPK, JNK et Limk (Sieber *et al.*, 2009). Ils jouent un rôle particulièrement sur la réorganisation du cytosquelette, mais peuvent également potentialiser ou inhiber la transcription des BR-Smads (Derynck et Zhang, 2003). Il serait intéressant d'analyser le statut de cette voie Smad indépendante suite à la délétion individuelle de chaque BR-Smad afin d'évaluer s'il y a une suractivation de cette voie par immunobuvardage avec des anticorps dirigés contre les formes actives de ces protéines (p-p38 MAPK, p-Limk, p-Jun). L'utilisation d'inhibiteur spécifique pour p38 MAPK ou JNK, chez les cellules, pourrait également permettre de vérifier l'implication de la voie Smad indépendante dans la prolifération, la migration, la détermination et la différenciation des cellules épithéliales intestinales.

## V. Conclusions et perspectives

Ces travaux ont permis de mettre en évidence que les BR-Smads ont des rôles distincts au niveau de la prolifération, de la migration et de la différenciation des cellules caliciformes et de Paneth. En plus d'avoir des rôles distincts, les résultats obtenus suggèrent également que les BR-Smads ont des rôles combinatoires dans la différenciation des cellules caliciformes et la détermination des cellules entéroendocrines.

Les modèles générés avec les IEC-6 shSmad confirment les résultats obtenus pour le rôle de Smad1 dans la prolifération et le rôle de Smad5 dans la migration cellulaire. Ces modèles seront d'une grande utilité pour l'étude des mécanismes cellulaires modulés par Smad1 ou Smad5.

Smad1 semble être l'effecteur de la voie des Bmps impliqué dans le contrôle de la prolifération cellulaire. La perte de *Smad1* n'est cependant pas suffisante pour initier la carcinogenèse, mais pourrait potentialiser le développement de celle-ci une fois initiée. L'analyse des rôles plus précis de Smad1 dans la régulation de la prolifération et particulièrement l'effet de la perte de Smad1 sur l'activité de la voie Wnt permettront de mieux comprendre son rôle dans le contrôle de la prolifération. L'analyse de la voie Wnt et la visualisation des cellules souches *Lgr5+* suite à la perte de Smad1 permettront de vérifier si ce dernier est l'effecteur principal de la voie des Bmps dans le maintien de la niche des cellules souches. L'utilisation des cellules IEC-6 shSmad1 permettra de compléter l'analyse du rôle de Smad1 dans la prolifération de l'épithélium intestinal. De plus, ce modèle facilitera l'observation de l'activité de la voie Wnt suite à la diminution de Smad1 à l'aide d'essai luciférase avec le promoteur TOPFlash qui permet de quantifier l'activité de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine/Tcf.

Smad5 semble être l'effecteur majeur des Bmps impliqué dans la migration cellulaire. L'utilisation des cellules IEC-6 shSmad5 permettra et facilitera l'étude plus approfondie de l'implication de Smad5 dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Des immunofluorescences avec des anticorps dirigés contre différentes protéines impliquées dans l'adhésion ou la réorganisation du cytosquelette pourront être effectuées sur une monocouche de cellules IEC-6 shSmad5 blessées avec une lame de rasoir permettant de visualiser ces protéines dans un contexte de migration. Il serait également possible d'utiliser différents inhibiteurs pharmacologiques contre Rac1, RhoA ou Cdc42 afin d'identifier les protéines ou les voies de signalisation impliquées dans la migration des cellules shSmad5. Les cellules IEC-6 shSmad5 permettront également d'analyser plus facilement la localisation et le dosage de l'activité des petites protéines G de la famille Rho afin de vérifier s'il y a des modulations suite à la perte de Smad5. De plus, ces cellules permettront de mesurer la concentration de calcium intracellulaire afin de vérifier l'implication du calcium libre via la Calcineurine dans la déphosphorylation de la cofiline suite à la perte de Smad5. Ces analyses permettront de mieux cibler et comprendre l'implication de Smad5 dans la migration des cellules épithéliales intestinales.

Quant aux rôles de Smad1 et Smad5 dans la différenciation des cellules caliciformes, la quantification de l'expression des gènes clés impliqués dans ce processus permettra de mieux caractériser leurs rôles respectifs dans la formation et la maturation des vésicules de mucus ainsi que la taille des cellules. Il en est de même pour le rôle de Smad1 dans la différenciation des cellules de Paneth.

Smad8, quant à lui, ne semble pas avoir pour l'instant de rôle majeur au niveau de la prolifération, de la migration ou de la différenciation l'épithélium intestinal. Par contre, des analyses plus approfondies et à long terme sont requises. La délétion classique de Smad8 chez la souris n'entraînait aucun défaut majeur avant l'âge d'environ 8 mois où des défauts de vascularisation au niveau des poumons étaient observés, puis la présence d'adénocarcinomes à 1 an (Huang *et al.*, 2009). Il reste également à déterminer si la

réduction de la taille des cryptes et la diminution de la vitesse de migration sont dues à la perte de Smad8 ou à une suractivation de Smad1 et Smad5. De plus, les souris *Smad8*<sup>ΔCEI</sup> sont présentement en background génétique hybride ce qui peut affecter la variabilité des phénotypes observés. Une dérivation de background génétique vers un background C57BL/6 est présentement en cours. Ce background génétique est un modèle homozygote et ne possède pas de gènes modificateurs de pénétrance diminuant ainsi la variabilité des phénotypes observés.

Afin d'évaluer s'il peut y avoir compensation par les autres BR-Smads lors de la prolifération et la migration des cellules, il serait très intéressant d'effectuer la délétion de 2 ou des 3 BR-Smads en même temps. Pour ce faire, l'utilisation des lignées stables de cellules IEC-6 shSmad générées seraient de très bons modèles, car ils sont beaucoup plus rapide et moins coûteux que la génération de double mutant chez la souris. De plus, les shARN contre chacun des trois BR-Smads sont clonés dans des vecteurs possédant chacun une résistance à un antibiotique différent. Il est donc simple et rapide d'infecter les cellules avec des virus contenant chacune des constructions shSmad et de sélectionner les cellules avec la combinaison d'antibiotiques appropriée.

Pour évaluer la présence de la nécessité de la diminution de deux ou des trois BR-Smads en même temps pour affecter les processus de détermination ou de différenciation des cellules sécrétrices de l'épithélium intestinal, l'utilisation du modèle de co-culture généré au département d'anatomie et de biologie cellulaire au sein du laboratoire du professeur François Boudreau serait un excellent modèle. Ce modèle consiste en une co-culture de cellules IEC-6 surexprimant *Cdx2* et *Hnf4a* cultivées sur des fibroblastes d'embryons fœtaux humains (Lussier *et al.*, 2008). Suite à la co-culture, les cellules épithéliales sont pleinement différenciées et fonctionnelles et les quatre principaux types de cellules épithéliales y sont retrouvés (Lussier *et al.*, 2008). Il serait alors possible de générer des lignées stables de cellules IEC-6-*Cdx2*-*Hnf4a* exprimant plusieurs shSmad à la fois et ainsi être en mesure d'étudier l'impact de la délétion de plus d'un BR-Smad sur la



détermination et la différenciation des cellules épithéliales intestinales. De plus, avec ce modèle hétérologue (IEC-6-*Cdx2-Hnf4a* : rat/fibroblaste : humain), il est possible de quantifier le niveau d'expression de gènes cibles spécifiquement au niveau d'un seul compartiment cellulaire en utilisant des amorces spécifiques pour le rat (épithélium) ou pour l'humain (mésenchyme).

Suite à l'identification des gènes cibles modulés par la perte d'un ou plusieurs BR-Smad, des analyses bio-informatiques des séquences promotrices de ces gènes, mais également des essais de retardement sur gel permettront d'identifier s'il s'agit de cible transcriptionnelle directe ou indirecte des BR-Smads.

Ces travaux futurs permettront de mieux comprendre les mécanismes et l'implication de chaque BR-Smad dans les fonctions cellulaires de l'épithélium intestinal, mais également dans le développement et la progression des maladies inflammatoires intestinales ainsi que dans la carcinogenèse intestinale.

## VI. Remerciements

Je voudrais d'abord remercier ma directrice de recherche Pre Nathalie Perreault pour m'avoir accueilli dans son laboratoire depuis mon premier stage il y a quatre ans. Cette expérience fut très enrichissante.

Merci beaucoup à ma petite chérie qui m'endure depuis plus de cinq ans ainsi qu'à la Bête et le petit Diable poilu et mini-moi qui s'en vient, qui m'encouragent et me soutiennent. Je voudrais également remercier mes parents, famille et amis pour leurs encouragements et soutiens.

J'aimerais remercier les membres du laboratoire Évelyne Roy, Jessica Gagné-Sansfacon, Faïza Maloum, Sébastien Roy et plus particulièrement Joannie Allaire avec qui j'ai partagé le projet Smad5 ainsi que Benoit Auclair. J'aimerais également remercier Aline Simoneau et Christine Jones pour les conseils pour les tests de blessures et la culture cellulaire et particulièrement Sébastien Mongrain pour les conseils de clonage ainsi que pour la construction des vecteurs pLenti U6 puromycine et G418 qui m'ont permis de générer mes modèles cellulaires. Merci aussi à Denis Martel pour les photos en microscopie électronique.

Merci aux Drs Roberts, Zwijsen, Martin et Gumucio pour les souris *Smad1,5* ou *8*<sup>loxP/loxP</sup> et *VillineCre* sans qui ces travaux n'auraient pas été possible.

Je tiens également à remercier les professeurs Guillaume Grenier et Éric Rousseau pour avoir pris le temps de lire et corriger ce mémoire.

## VII. Bibliographie

- Agnew BJ, Minamide LS, Bamburg JR. 1995. Reactivation of phosphorylated actin depolymerizing factor and identification of the regulatory site. *J Biol Chem* **270**: 17582-17587.
- Alarcon C, Zaromytidou AI, Xi Q, Gao S, Yu J, Fujisawa S, Barlas A, Miller AN, Manova-Todorova K, Macias MJ, Sapkota G, Pan D, Massague J. 2009. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell* **139**: 757-769.
- Allaire JM, Darsigny M, Marcoux SS, Roy SA, Schmouth JF, Umans L, Zwijsen A, Boudreau F, Perreault N. 2011. Loss of Smad5 leads to the disassembly of the apical junctional complex and increased susceptibility to experimental colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **300**: G586-597.
- Aragon E, Goerner N, Zaromytidou AI, Xi Q, Escobedo A, Massague J, Macias MJ. 2011. A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes Dev* **25**: 1275-1288.
- Arnold SJ, Maretto S, Islam A, Bikoff EK, Robertson EJ. 2006. Dose-dependent Smad1, Smad5 and Smad8 signaling in the early mouse embryo. *Dev Biol* **296**: 104-118.
- Auclair BA, Benoit YD, Rivard N, Mishina Y, Perreault N. 2007. Bone morphogenetic protein signaling is essential for terminal differentiation of the intestinal secretory cell lineage. *Gastroenterology* **133**: 887-896.
- Babitt JL, Zhang Y, Samad TA, Xia Y, Tang J, Campagna JA, Schneyer AL, Woolf CJ, Lin HY. 2005. Repulsive guidance molecule (RGMa), a DRAGON homologue, is a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* **280**: 29820-29827.
- Bamburg JR. 1999. Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**: 185-230.
- Barker N, van Es JH, Kuipers J, Kujala P, van den Born M, Cozijnsen M, Haegebarth A, Korving J, Begthel H, Peters PJ, Clevers H. 2007. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **449**: 1003-1007.
- Bastide P, Darido C, Pannequin J, Kist R, Robine S, Marty-Double C, Bibeau F, Scherer G, Joubert D, Hollande F, Blache P, Jay P. 2007. Sox9 regulates cell proliferation and is required for Paneth cell differentiation in the intestinal epithelium. *J Cell Biol* **178**: 635-648.
- Benchabane H, Wrana JL. 2003. GATA- and Smad1-dependent enhancers in the Smad7 gene differentially interpret bone morphogenetic protein concentrations. *Mol Cell Biol* **23**: 6646-6661.
- Bengtsson L, Schwappacher R, Roth M, Boergermann JH, Hassel S, Knaus P. 2009. PP2A regulates BMP signalling by interacting with BMP receptor complexes and by

- dephosphorylating both the C-terminus and the linker region of Smad1. *J Cell Sci* **122**: 1248-1257.
- Cetin S, Ford HR, Sysko LR, Agarwal C, Wang J, Neal MD, Baty C, Apodaca G, Hackam DJ. 2004. Endotoxin inhibits intestinal epithelial restitution through activation of Rho-GTPase and increased focal adhesions. *J Biol Chem* **279**: 24592-24600.
- Chan MC, Nguyen PH, Davis BN, Ohoka N, Hayashi H, Du K, Lagna G, Hata A. 2007. A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP) signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol* **27**: 5776-5789.
- Chang H, Huylebroeck D, Verschueren K, Guo Q, Matzuk MM, Zwijsen A. 1999. Smad5 knockout mice die at mid-gestation due to multiple embryonic and extraembryonic defects. *Development* **126**: 1631-1642.
- Chang SF, Chang TK, Peng HH, Yeh YT, Lee DY, Yeh CR, Zhou J, Cheng CK, Chang CA, Chiu JJ. 2009. BMP-4 induction of arrest and differentiation of osteoblast-like cells via p21 CIP1 and p27 KIP1 regulation. *Mol Endocrinol* **23**: 1827-1838.
- Cheng H, Leblond CP. 1974a. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am J Anat* **141**: 461-479.
- Cheng H, Leblond CP. 1974b. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* **141**: 537-561.
- Ciacchi C, Lind SE, Podolsky DK. 1993. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* **105**: 93-101.
- Condeelis J. 2001. How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol* **11**: 288-293.
- Crosnier C, Stamatakis D, Lewis J. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nat Rev Genet* **7**: 349-359.
- de Caestecker MP, Yahata T, Wang D, Parks WT, Huang S, Hill CS, Shioda T, Roberts AB, Lechleider RJ. 2000. The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J Biol Chem* **275**: 2115-2122.
- Dennler S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier JM. 1998. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J* **17**: 3091-3100.
- Derynck R, Zhang YE. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* **425**: 577-584.
- Dignass AU, Podolsky DK. 1993. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* **105**: 1323-1332.

- Dignass AU, Tsunekawa S, Podolsky DK. 1994. Fibroblast growth factors modulate intestinal epithelial cell growth and migration. *Gastroenterology* **106**: 1254-1262.
- dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, Nosworthy NJ. 2003. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**: 433-473.
- Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massague J, Bernard O. 2003. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* **162**: 1089-1098.
- Fortuno ES, 3rd, LeSueur JA, Graff JM. 2001. The amino terminus of Smads permits transcriptional specificity. *Dev Biol* **230**: 110-124.
- Ghosh-Choudhury N, Ghosh-Choudhury G, Celeste A, Ghosh PM, Moyer M, Abboud SL, Kreisberg J. 2000. Bone morphogenetic protein-2 induces cyclin kinase inhibitor p21 and hypophosphorylation of retinoblastoma protein in estradiol-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta* **1497**: 186-196.
- Ghosh M, Song X, Mouneimne G, Sidani M, Lawrence DS, Condeelis JS. 2004. Cofilin promotes actin polymerization and defines the direction of cell motility. *Science* **304**: 743-746.
- Haramis AP, Begthel H, van den Born M, van Es J, Jonkheer S, Offerhaus GJ, Clevers H. 2004. De novo crypt formation and juvenile polyposis on BMP inhibition in mouse intestine. *Science* **303**: 1684-1686.
- Hartung A, Bitton-Worms K, Rechtman MM, Wenzel V, Boergermann JH, Hassel S, Henis YI, Knaus P. 2006. Different routes of bone morphogenetic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* **26**: 7791-7805.
- Hata A, Lagna G, Massague J, Hemmati-Brivanlou A. 1998. Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* **12**: 186-197.
- Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu YY, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Jr., Wrana JL, Falb D. 1997. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* **89**: 1165-1173.
- He XC, Zhang J, Tong WG, Tawfik O, Ross J, Scoville DH, Tian Q, Zeng X, He X, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. 2004. BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. *Nat Genet* **36**: 1117-1121.
- Huang S, Tang B, Usoskin D, Lechleider RJ, Jamin SP, Li C, Anzano MA, Ebendal T, Deng C, Roberts AB. 2002. Conditional knockout of the Smad1 gene. *Genesis* **32**: 76-79.
- Huang Z, Wang D, Ihida-Stansbury K, Jones PL, Martin JF. 2009. Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet* **18**: 2791-2801.
- Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K. 2000. Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor.

- Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J Biol Chem* **275**: 6075-6079.
- Itasaki N, Hoppler S. 2010. Crosstalk between Wnt and bone morphogenic protein signaling: a turbulent relationship. *Dev Dyn* **239**: 16-33.
- Jeffery TK, Upton PD, Trembath RC, Morrell NW. 2005. BMP4 inhibits proliferation and promotes myocyte differentiation of lung fibroblasts via Smad1 and JNK pathways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**: L370-378.
- Katagiri T, Imada M, Yanai T, Suda T, Takahashi N, Kamijo R. 2002. Identification of a BMP-responsive element in Id1, the gene for inhibition of myogenesis. *Genes Cells* **7**: 949-960.
- Katz JP, Perreault N, Goldstein BG, Lee CS, Labosky PA, Yang VW, Kaestner KH. 2002. The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development* **129**: 2619-2628.
- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, Wrana JL. 2000. Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol Cell* **6**: 1365-1375.
- Korchynskyi O, ten Dijke P. 2002. Identification and functional characterization of distinct critically important bone morphogenetic protein-specific response elements in the Id1 promoter. *J Biol Chem* **277**: 4883-4891.
- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H. 1998. Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat Genet* **19**: 379-383.
- Kretzschmar M, Doody J, Massague J. 1997. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* **389**: 618-622.
- Kwon T, Kwon DY, Chun J, Kim JH, Kang SS. 2000. Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J Biol Chem* **275**: 423-428.
- Langlois MJ, Roy SA, Auclair BA, Jones C, Boudreau F, Carrier JC, Rivard N, Perreault N. 2009. Epithelial phosphatase and tensin homolog regulates intestinal architecture and secretory cell commitment and acts as a modifier gene in neoplasia. *FASEB J* **23**: 1835-1844.
- Li X, Madison BB, Zacharias W, Kolterud A, States D, Gumucio DL. 2007. Deconvoluting the intestine: molecular evidence for a major role of the mesenchyme in the modulation of signaling cross talk. *Physiol Genomics* **29**: 290-301.
- Lopez-Rovira T, Chalaux E, Massague J, Rosa JL, Ventura F. 2002. Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* **277**: 3176-3185.
- Lussier CR, Babeu JP, Auclair BA, Perreault N, Boudreau F. 2008. Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**: G418-428.

- Luyten FP, Cunningham NS, Ma S, Muthukumaran N, Hammonds RG, Nevins WB, Woods WI, Reddi AH. 1989. Purification and partial amino acid sequence of osteogenin, a protein initiating bone differentiation. *J Biol Chem* **264**: 13377-13380.
- Madison BB, Braunstein K, Kuizon E, Portman K, Qiao XT, Gumucio DL. 2005. Epithelial hedgehog signals pattern the intestinal crypt-villus axis. *Development* **132**: 279-289.
- Madison BB, Dunbar L, Qiao XT, Braunstein K, Braunstein E, Gumucio DL. 2002. Cis elements of the villin gene control expression in restricted domains of the vertical (crypt) and horizontal (duodenum, cecum) axes of the intestine. *J Biol Chem* **277**: 33275-33283.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* **67**: 753-791.
- Meberg PJ, Ono S, Minamide LS, Takahashi M, Bamberg JR. 1998. Actin depolymerizing factor and cofilin phosphorylation dynamics: response to signals that regulate neurite extension. *Cell Motil Cytoskeleton* **39**: 172-190.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. 2005. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**: 251-263.
- Moser AR, Pitot HC, Dove WF. 1990. A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**: 322-324.
- Nakahiro T, Kurooka H, Mori K, Sano K, Yokota Y. 2010. Identification of BMP-responsive elements in the mouse *Id2* gene. *Biochem Biophys Res Commun* **399**: 416-421.
- Nakao A, Afrakhte M, Moren A, Nakayama T, Christian JL, Heuchel R, Itoh S, Kawabata M, Heldin NE, Heldin CH, ten Dijke P. 1997. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* **389**: 631-635.
- Niculescu AB, 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI. 1998. Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* **18**: 629-643.
- Nishimura R, Hata K, Ikeda F, Matsubara T, Yamashita K, Ichida F, Yoneda T. 2003. The role of Smads in BMP signaling. *Front Biosci* **8**: s275-284.
- Nishita M, Wang Y, Tomizawa C, Suzuki A, Niwa R, Uemura T, Mizuno K. 2004. Phosphoinositide 3-kinase-mediated activation of cofilin phosphatase Slingshot and its role for insulin-induced membrane protrusion. *J Biol Chem* **279**: 7193-7198.
- Nomura M, Li E. 1998. Smad2 role in mesoderm formation, left-right patterning and craniofacial development. *Nature* **393**: 786-790.
- Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, Gawantka V, Delius H, Massague J, Niehrs C. 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature* **401**: 480-485.
- Perreault N, Beaulieu JF. 1998. Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* **245**: 34-42.

- Perreault N, Katz JP, Sackett SD, Kaestner KH. 2001. Foxl1 controls the Wnt/beta-catenin pathway by modulating the expression of proteoglycans in the gut. *J Biol Chem* **276**: 43328-43333.
- Pinto D, Robine S, Jaisser F, El Marjou FE, Louvard D. 1999. Regulatory sequences of the mouse villin gene that efficiently drive transgenic expression in immature and differentiated epithelial cells of small and large intestines. *J Biol Chem* **274**: 6476-6482.
- Podolsky DK, Lynch-Devaney K, Stow JL, Oates P, Murgue B, DeBeaumont M, Sands BE, Mahida YR. 1993. Identification of human intestinal trefoil factor. Goblet cell-specific expression of a peptide targeted for apical secretion. *J Biol Chem* **268**: 6694-6702.
- Potten CS, Kovacs L, Hamilton E. 1974. Continuous labelling studies on mouse skin and intestine. *Cell Tissue Kinet* **7**: 271-283.
- Rao JN, Liu SV, Zou T, Liu L, Xiao L, Zhang X, Bellavance E, Yuan JX, Wang JY. 2008. Rac1 promotes intestinal epithelial restitution by increasing Ca<sup>2+</sup> influx through interaction with phospholipase C-(gamma)1 after wounding. *Am J Physiol Cell Physiol* **295**: C1499-1509.
- Samad TA, Rebbapragada A, Bell E, Zhang Y, Sidis Y, Jeong SJ, Campagna JA, Perusini S, Fabrizio DA, Schneyer AL, Lin HY, Brivanlou AH, Attisano L, Woolf CJ. 2005. DRAGON, a bone morphogenetic protein co-receptor. *J Biol Chem* **280**: 14122-14129.
- Sangiorgi E, Capecchi MR. 2008. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet* **40**: 915-920.
- Sapkota G, Alarcon C, Spagnoli FM, Brivanlou AH, Massague J. 2007. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* **25**: 441-454.
- Sato T, van Es JH, Snippert HJ, Stange DE, Vries RG, van den Born M, Barker N, Shroyer NF, van de Wetering M, Clevers H. 2011. Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts. *Nature* **469**: 415-418.
- Satow R, Kurisaki A, Chan TC, Hamazaki TS, Asashima M. 2006. Dullard promotes degradation and dephosphorylation of BMP receptors and is required for neural induction. *Dev Cell* **11**: 763-774.
- Scoville DH, Sato T, He XC, Li L. 2008. Current View: Intestinal Stem Cells and Signaling. *Gastroenterology* **134**: 849-864.
- Sekiya T, Adachi S, Kohu K, Yamada T, Higuchi O, Furukawa Y, Nakamura Y, Nakamura T, Tashiro K, Kuhara S, Ohwada S, Akiyama T. 2004a. Identification of BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI), an inhibitor of transforming growth factor-beta signaling, as a target of the beta-catenin pathway in colorectal tumor cells. *J Biol Chem* **279**: 6840-6846.
- Sekiya T, Oda T, Matsuura K, Akiyama T. 2004b. Transcriptional regulation of the TGF-beta pseudoreceptor BAMBI by TGF-beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **320**: 680-684.



- Shi Y, Massague J. 2003. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**: 685-700.
- Shi Y, Wang YF, Jayaraman L, Yang H, Massague J, Pavletich NP. 1998. Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. *Cell* **94**: 585-594.
- Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* **20**: 343-355.
- Spiering D, Hodgson L. 2011. Dynamics of the Rho-family small GTPases in actin regulation and motility. *Cell Adh Migr* **5**: 170-180.
- Sun J, Chen H, Chen C, Whitsett JA, Mishina Y, Bringas P, Jr., Ma JC, Warburton D, Shi W. 2008. Prenatal lung epithelial cell-specific abrogation of Alk3-bone morphogenetic protein signaling causes neonatal respiratory distress by disrupting distal airway formation. *Am J Pathol* **172**: 571-582.
- Takase M, Imamura T, Sampath TK, Takeda K, Ichijo H, Miyazono K, Kawabata M. 1998. Induction of Smad6 mRNA by bone morphogenetic proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **244**: 26-29.
- Theil T, Aydin S, Koch S, Grotewold L, Ruther U. 2002. Wnt and Bmp signalling cooperatively regulate graded Emx2 expression in the dorsal telencephalon. *Development* **129**: 3045-3054.
- Tremblay KD, Dunn NR, Robertson EJ. 2001. Mouse embryos lacking Smad1 signals display defects in extra-embryonic tissues and germ cell formation. *Development* **128**: 3609-3621.
- Umans L, Vermeire L, Francis A, Chang H, Huylebroeck D, Zwijsen A. 2003. Generation of a floxed allele of Smad5 for cre-mediated conditional knockout in the mouse. *Genesis* **37**: 5-11.
- Urist MR. 1965. Bone: formation by autoinduction. *Science* **150**: 893-899.
- van Es JH, Jay P, Gregorieff A, van Gijn ME, Jonkheer S, Hatzis P, Thiele A, van den Born M, Begthel H, Brabletz T, Taketo MM, Clevers H. 2005. Wnt signalling induces maturation of Paneth cells in intestinal crypts. *Nat Cell Biol* **7**: 381-386.
- Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. 2005. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by Slingshot via calcineurin. *J Biol Chem* **280**: 12683-12689.
- Weeks CS, Tanabe H, Cummings JE, Crampton SP, Sheynis T, Jelinek R, Vanderlick TK, Cocco MJ, Ouellette AJ. 2006. Matrix metalloproteinase-7 activation of mouse paneth cell pro-alpha-defensins: SER43 down arrow ILE44 proteolysis enables membrane-disruptive activity. *J Biol Chem* **281**: 28932-28942.
- Weinstein M, Yang X, Li C, Xu X, Gotay J, Deng CX. 1998. Failure of egg cylinder elongation and mesoderm induction in mouse embryos lacking the tumor suppressor smad2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9378-9383.
- Wertz JW, Bauer PM. 2008. Caveolin-1 regulates BMPRII localization and signaling in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* **375**: 557-561.

- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* **242**: 1528-1534.
- Xu B, Chen C, Chen H, Zheng SG, Bringas P, Jr., Xu M, Zhou X, Chen D, Umans L, Zwijsen A, Shi W. 2011. Smad1 and its target gene Wif1 coordinate BMP and Wnt signaling activities to regulate fetal lung development. *Development* **138**: 925-935.
- Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE. 1998. Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol Cell* **1**: 611-617.
- Zhan Q, Bamburg JR, Badwey JA. 2003. Products of phosphoinositide specific phospholipase C can trigger dephosphorylation of cofilin in chemoattractant stimulated neutrophils. *Cell Motil Cytoskeleton* **54**: 1-15.
- Zhu H, Kavsak P, Abdollah S, Wrana JL, Thomsen GH. 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**: 687-693.